

Biochemisches Institut am Klinikum
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Analyse der posttranslationalen Modifikationen von Proteinen in den
Mikrofilarienscheiden von *Litomosoides sigmodontis***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Fachbereich Biologie

Vorgelegt von

Martin Kasper
aus Bremerhaven

Gießen
SS 2000

Naturam primum cognoscere rerum

Lucretius (95-55 v.Chr.)

DE RERUM NATURA (III, 1072)

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung

I.1 Filarien und Filariosen	1
I.1.1 Biologie und Epidemiologie	1
I.1.2 Pathogenese	4
I.1.3 Tiermodelle	6
I.1.4 Evasionsstrategien	7
I.2 Die Scheide der Mikrofilarien	10
I.2.1 Genese, Morphologie und Ultrastruktur	10
I.2.2 Histochemische Untersuchungen	11
I.2.3 Lektinbindungsstudien	11
I.2.4 Isolierung und biochemische Analysen	11
I.2.5 Modifikationen	13
I.2.5.1 ϵ -(γ -Glutamyl-)Lysin	13
I.2.5.2 Glykosylierung	13
I.2.5.2.1 N-Glykosylierung	14
I.2.5.2.2 O-Glykosylierung	15
I.3 Aufgabenstellung	17

II Material und Methoden

II.1 Gewinnung von Mikrofilarienscheiden	18
II.2 Isolierung einzelner Scheiden- proteine	19
II.3 Hochleistungsflüssigkeitschroma- tographie (HPLC)	20
II.4 Fmoc-Aminosäureanalytik	21
II.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	22
II.6 Färbemethoden	22
II.6.1 Silberfärbung	22
II.6.2 Coomassie	23
II.6.3 Stains-All®-Färbung	23
II.7 Matrix-unterstützte Laserdesorp- tions-/Ionisations-Flugzeitmas- senspektrometrie (MALDI-TOF- MS)	23
II.8 Untersuchung auf Teichonsäure	24
II.8.1 Untersuchung auf Cholin	24
II.8.2 Untersuchung auf Glycerol	25

II.9	Isolierung und Identifikation des Bausteins Dimethylaminoethanol (DMAE)	26
II.9.1	Präparative Gasphasenanalyse	26
II.9.2	NMR-Messung	26
II.10	Analyse der Kohlenhydrate	26
II.10.1	Reduktive Beta-Eliminierung von <i>O</i> -Glykanen	27
II.10.2	Freisetzung der <i>O</i> -Glykane mit Hydrazin	28
II.10.2.1	Methode nach Kobata	28
II.10.2.2	Methode nach Patel	28
II.10.2.3	Methode nach Cooper	29
II.10.3	Methylierung von Glykanen	29
II.10.4	Derivatisierung freigesetzter <i>O</i> -Glykane	30
II.10.4.1	Derivatisierung mit 1-Phenyl-3-methyl-pyrazolin-5-on (PMP)	30
II.10.4.2	Basteinanalyse mit Anthranilsäure-Derivatisierung	32
II.11	Chemische Synthesen	33
II.11.1	Direkte Kopplung von Phosphorsäure- <i>N,N</i> -dimethylester	33
II.10.1.1	Kopplung mit Rinderinsulin, -serumalbumin und Ovalbumin	33
II.10.2	Kopplung von Phospho-DMAE über p-Aminophenol	34
III	Ergebnisse	37
III.1	SDS-PAGE von <i>L.sigmodontis</i>-Scheiden/Stains-All-Färbung	37
III.2	Fmoc-Aminosäureanalyse	38
III.3	Glycerol- und Cholin-Analysen	40
III.4	Isolierung und Strukturbestimmung des Bausteins DMAE als Fmoc-Derivat	40
III.5	Kohlenhydrate	46
III.5.1	Gaschromatographie	46
III.5.2	PMP-Derivatisierung	48
III.5.3	Anthranilsäure-Derivatisierung	49

III.6	Massenspektrometrie	49
	III.6.1 Kohlenhydrate	49
	III.6.2 shp3a	54
III.7	Chemische Synthesen	55
V.	Diskussion	57
IV.	Zusammenfassung und Ausblick	65
VI.	Literaturverzeichnis	68
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin	MALDI-TOF-MS	
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität		Matrix-unterstützte Laser-desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
Asn	Asparagin	Man	Mannose
B	Aspartat bzw. Asparagin	Mf/Mff	Mikrofilarie/Mikrofilarien
CD	Differenzierungscluster	MMIF	Monozyten-Makrophagen-Wanderungsinhibitionsfaktoren
COSY	correlation spectroscopy	P	Prolin
Di-Y	doppelt mit Fmoc derivatisiertes Tyrosin	PBS	phosphate buffered saline
DEC	Diethylcarbamazin	P-OH	Hydroxyprolin
DMAE	<i>N,N</i> -Dimethylaminoethanol	PTFE	Polytetrafluorethylen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	R	Arginin
ER	endoplasmatisches Retikulum	RER	rauhes ER
ES	exkretorisch-sekretorisch	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
F	Phenylalanin	Ser/S	Serin
Fmoc	9-Fluorenyl-methyl-oxycarbonyl-	spp.	Subspezies
G	Glycin	TCR	T-Zellrezeptor
Gal	Galaktose	TFA	Trifluoressigsäure
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin	TGN	Trans-Golginetzwerk
GC	Gaschromatographie	Thr/T	Threonin
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie	TPE	Tropische Pulmonale Eosinophilie
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin	Tris	Tris-(hydroxyethyl)aminomethan
H	Histidin	UDP	Uridindiphosphat
HCl	Salzsäure	V	Valin
HF	Flußsäure	WGA	Weizenkeim-Agglutinin
¹ H-NMR	protonenkernmagnetische Resonanzspektroskopie	WHO	Weltgesundheitsorganisation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	Y	Tyrosin
I	Isoleucin	Z	Glutamat bzw. Glutamin
IgG(M,E)	Immunglobuline der Klasse G, M und E		
K	Lysin		
kDa	kiloDalton		
K-OH	Hydroxylysin		
L	Leucin		
M	Methionin		

I. Einleitung

I.1 Filarien und Filariosen

I.1.1 Biologie und Epidemiologie

Unter dem Begriff Filariose versteht man allgemein die Infektion mit den humanpathogenen Nematoden *Wuchereria bancrofti*, *Brugia* spp., *Onchocerca volvulus*, *Loa loa* und *Mansonella* spp.. Als „lymphatische Filariosen“ werden jene Infektionen bezeichnet, die durch die Lokalisation der adulten Filarien (Fadenwürmer) von *W. bancrofti* und *Brugia* spp. und der daraus induzierten Immunpathologie entstehen.

Die Erreger der menschlichen Filariosen sind parasitische Rundwürmer vom Unterstamm NEMATODA aus der Überfamilie der FILARIOIDEA. Abb. 1 gibt eine kurze systematische Übersicht über die Organisation der Nematoden.

Filarien und die von ihnen hervorgerufenen Erkrankungen stellen in vielen tropischen, vornehmlich Entwicklungsländern, ein Gesundheitsproblem ersten Ranges dar. Weltweit sind 100 Millionen Menschen mit verschiedenen Arten dieser Parasiten befallen [1]. Jedoch wird die Zahl der Infizierten auf insgesamt 400 Millionen geschätzt.

Die Filarioidea sind ausschließlich getrenntgeschlechtlich, wobei das Männchen stets kleiner als das Weibchen ist. Die weiblichen Filarien gebären Larven, die Mikrofilarien (Mff). Diese Mikrofilarien müssen, um ihre weitere Entwicklung fortsetzen zu können, von blutsaugenden Gliederfüßern (Arthropoden), ihren Überträgern (Vektoren), aufgenommen werden. Die Hauptüberträger gehören zu den Mücken der *Culex*-Arten. Mikrofilarien, die mit der Blutmahlzeit des Überträgers aufgenommen werden (Larvenstadium L1), entwickeln sich zunächst zum zweiten Larvenstadium (L2), und später zur infektiösen Larve (L3). Diese wandert in die Kopfkapsel des Zwischenwirts ein und kann beim folgenden Saugakt auf den Endwirt übertragen werden. Nach zwei weiteren Häutungen im Endwirt entwickelt sich ein juve-

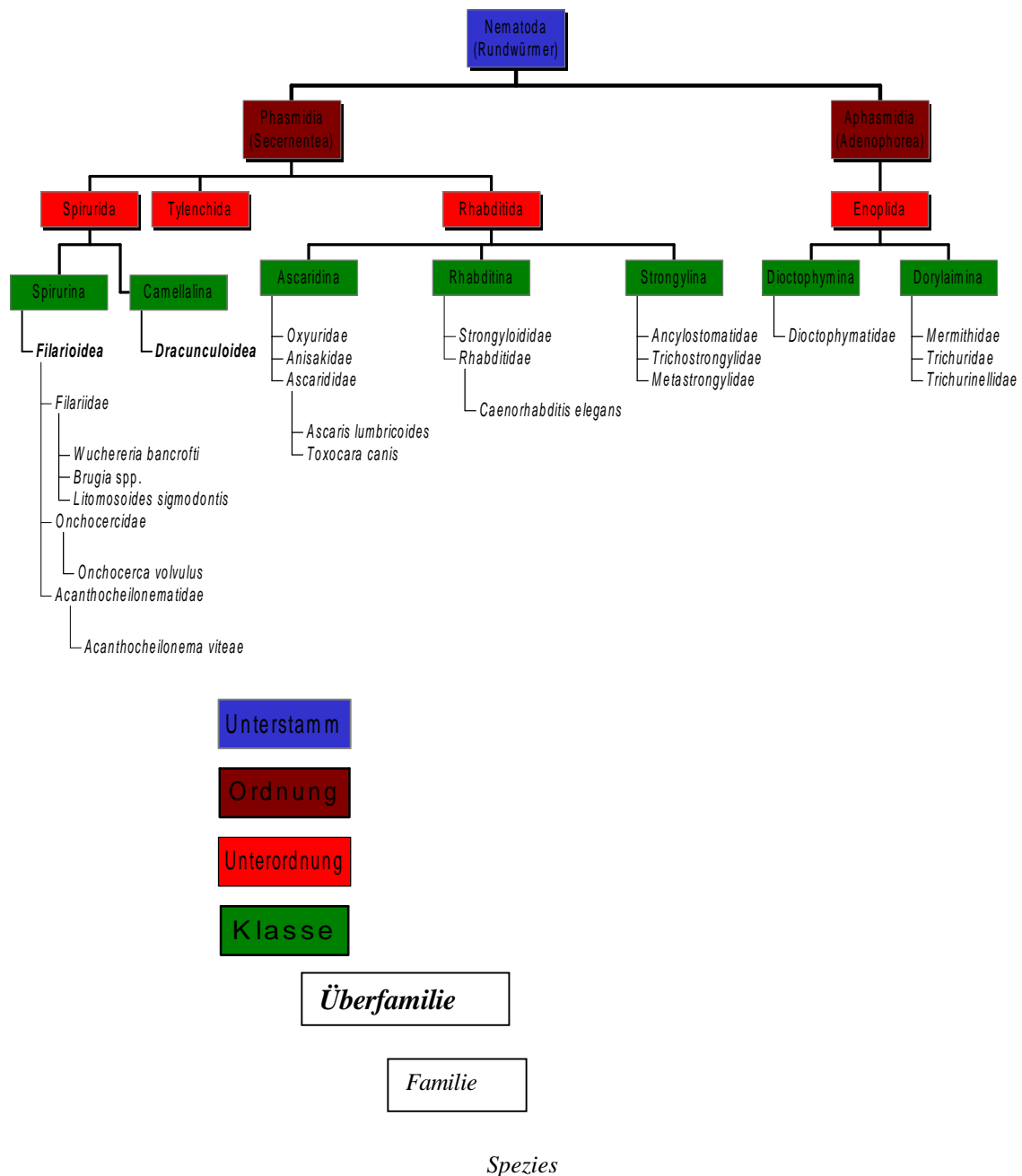


Abb.1: Taxonomische Einordnung innerhalb des Unterstammes der Nematoden nach Dönges [2]. Der Übersichtlichkeit halber wurden nur ausgewählte Familien und Spezies aufgeführt.

Einleitung

niler, präadulter Wurm, der nach einigen Monaten Geschlechtsreife erlangt (L4) (s. Abb. 2) [3, 4]. Bei den lymphatischen Filariosen des Menschen leben die adulten Filarien knäuelartig zusammenliegend in den Lymphgefäßen und im Sinus der Lymphknoten, hauptsächlich im Bereich des Beckens und der unteren Extremitäten [1]. Die Mikrofilarien zirkulieren im Tagesverlauf periodisch oder aperiodisch im peripheren Blut. Damit haben sie sich optimal der Stechaktivität ihrer Überträger angepaßt.

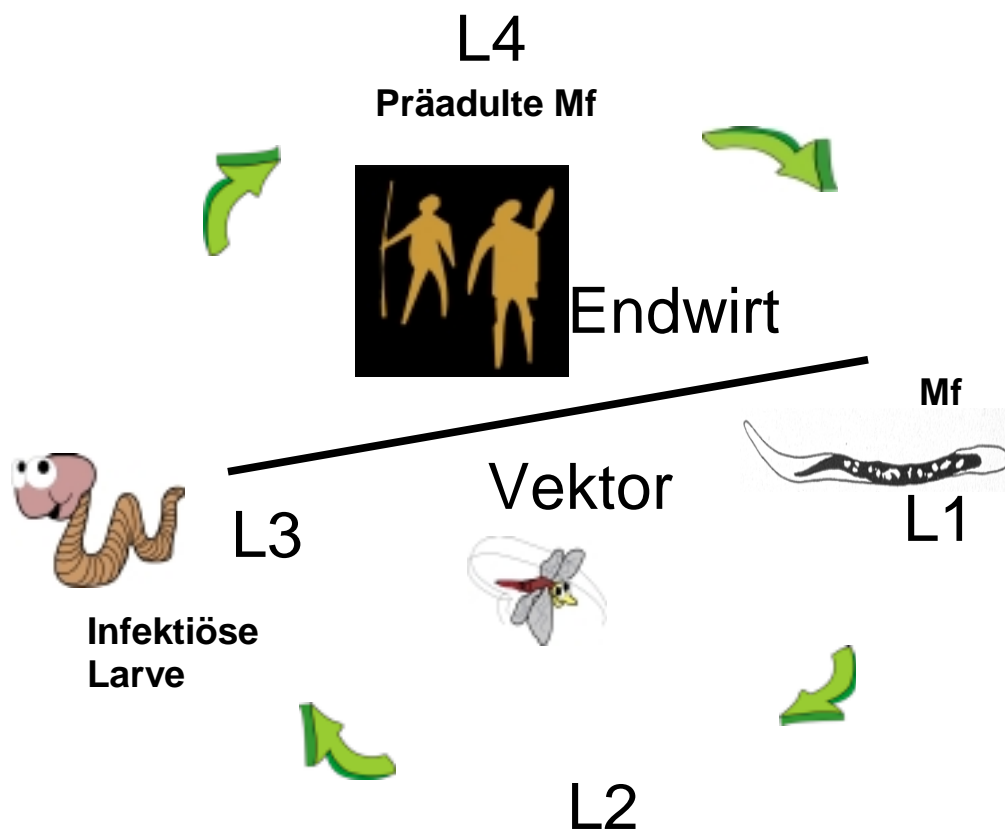


Abb.2: Allgemeiner Entwicklungszyklus von Filarien mit ihren Vektoren und Endwirten.
Mf, Mikrofilarie

Die Epidemiologie der Mikrofilarien wird überwiegend durch ihre Überträger bestimmt, welche sich in Gebieten mit konstanter Wärme und gleichzeitig hoher Luftfeuchtigkeit vermehren. Die räumliche Nähe stehender Gewässer und menschlicher Wohnungen in den Tropen und Subtropen ermöglicht die Übertragung selbst in Städten, wo *Culex*-Arten auch in verschmutzten Gewässern brüten können. Demgegenüber sind die Larvenstadien der Überträgermücken von *O. volvulus* (*Simulium*-Arten) auf fließende Gewässer angewiesen, so daß die Onchozerkose entlang von Flüssen besonders häufig ist und daher auch als Flußblindheit bezeichnet wird [1,5].

Bedingt durch die lange Lebensdauer von Filarien im Endwirt, entstehen in der Regel chronische Erkrankungen, die meist auf immunpathologische Reaktionen des Wirts zurückgehen. Da sich individuell bei infizierten Patienten ein Spektrum von Krankheitsbildern entwickelt, wird die Filariose auch als „spektrale Erkrankung“ bezeichnet. Je nach individueller Immunreaktion entsteht bei langanhaltender Re-Infektion durch Vektoren (Super-Infektion) als auffälligstes Krankheitsbild die Elephantiasis, eine entzündliche Anschwellung der Lymphdrüsen, die zur extremen Ausdehnung der Extremitäten führt. Daneben ist noch die Tropische Pulmonale Eosinophilie (TPE) zu nennen. Aber auch die anfangs unauffälligen Krankheitsverläufe sind für die Betroffenen mit starken Einbußen der Gesundheit und der Lebensqualität verbunden.

Seit mittlerweile Jahrzehnten werden weltweit Filariose-Bekämpfungsprogramme von der WHO angestrengt, die anfangs lediglich die Vernichtung der Vektoren zum Ziel hatte, um die Übertragung des Parasiten von Mensch zu Mensch zu unterbrechen. In der Zwischenzeit wurde mit der Entwicklung von Filariziden wie Ivermectin und Diethylcarbamazin (DEC, z.B. Hetrazan, Banocid) geeignete Medikamente gefunden [6]. Letztlich ist es die Strategie dieser Programme, mit Hilfe von Massenchemotherapie in Kombination mit Vektorbekämpfung die Übertragung des Parasiten so lange zu unterbrechen, bis die Parasitenpopulation in der menschlichen Bevölkerung ausgestorben ist.

I.1.2 Pathogenese

Der Infektionsverlauf, die Pathogenese und die Bedeutung von spezifischen Immunantworten im Verlauf einer Filarieninfektion sind durch neuere Arbeiten klarer geworden. Untersuchungen an Humanfilariosen und an Tiermodellen zeigten, daß protektive Immunantworten gegen Filarienin-

fektionen existieren [7,8]. Es lassen sich vier immunologische Reaktionstypen und deren klinische Manifestationen unterscheiden:

- **Asymptomatischer, Mikrofilarien-positiver Typ:** ein Großteil der Infizierten ist nachweislich jahrelang Mikrofilarien-positiv, weist aber kaum oder nur geringfügige pathologische Veränderungen auf und wird daher zellimmunologisch als hyporeaktiv oder supprimiert bezeichnet
- **Asymptomatischer, Mikrofilarien-negativer Typ:** ein Teil der exponierten Bevölkerung in endemischen Gebieten zeigt weder eine klinische Manifestation noch können Mikrofilarien nachgewiesen werden. Diese Personen werden als „potentiell immun“ angesehen und sind von großem Interesse, um protektive Immunantworten zu charakterisieren
- **Symptomatischer, chronischer Typ:** bei diesem Typ, der ebenfalls supprimiert erscheint, zeigen sich pathologische Veränderungen an Haut, Augen oder Lymphgefäßen, und Mikrofilarien können nachgewiesen werden.
- **Hyperreaktiver Typ:** bei den Infizierten treten – oftmals akut und lokal begrenzt – Lymphangitis, Lymphadenitis, schmerzhafte Lymphknoten, ödemartig geschwollene Körperteile neben Fieber auf. Es wurde eine zelluläre Hyperreaktivität beobachtet, trotzdem konnten oft keine oder nur sehr wenige Mikrofilarien nachgewiesen werden [7]

Eine Infektion mit Filarien führt zur Produktion von spezifischen Antikörpern (IgG, IgM u. IgE) die gegen eine Vielzahl von Filarienantigenen gerichtet sind. Wie Karam et al. und Ottesen et al. zeigen konnten, nimmt der Anteil der spezifischen Immunglobuline bei chronischem Verlauf der Krankheit des Patienten ab, was sehr wahrscheinlich auf eine Suppression der humoralen Immunantwort zurückzuführen ist [9,10].

Ein wichtiger Effektormechanismus bei der Eliminierung von Mikrofilarien ist die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), die besonders gegen infektiöse Larven 3 oder juvenile Filarien von Bedeutung ist. Beim Auftreten dieser Larvenstadien im Blut infizierter Patienten lagern sich – durch Antikörper stimuliert – Granulozyten und Makrophagen an (s. Abb. 3) [11,12]. Jedoch führen diese Abwehrmechanismen auch zu den typischen Begleit-

erscheinungen der Filariosen, denn die extrem hohen filarienspezifischen IgE-Titer können allergische Reaktionen induzieren. Diese Immunreaktion wird besonders stark bei Patienten nach einer DEC-Therapie beobachtet.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß zum einen auf humoraler Ebene kein Beweis einer protektiven Abwehr von Parasiten durch filarienspezifische Antikörper existiert. Zum anderen sind auf zellulärer Ebene Mikrofilarien zwar ursächlich an der Modulation von T-Zellen beteiligt, der Mechanismus bleibt jedoch bislang unklar.

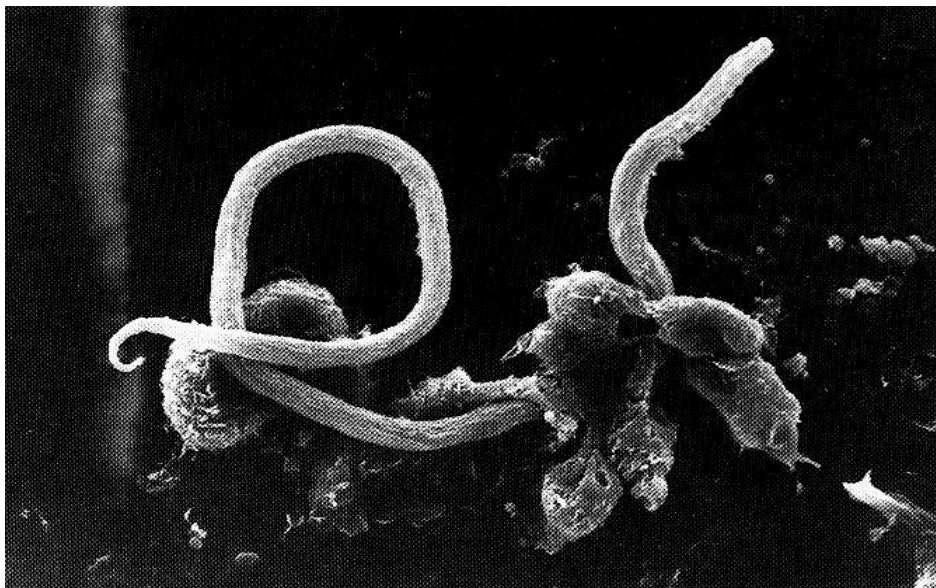


Abb. 3: Peritonealmakrophagen von *Meriones unguiculatus* greifen antikörper-opsonierte Mikrofilarien von *Acanthocheilonema viteae* an [13].

I.1.3 Tiermodelle

Eine wichtige Voraussetzung, um Filariosen und ihre Pathogenese zu studieren, ist ein gut charakterisiertes Tiermodell mit standardisierten Labortieren. Auf Grund der ausgesprochen hohen Wirtsspezifität ist es nicht möglich, *W. bancrofti* oder *O. volvulus* in einem der üblichen Tiermodelle zu studieren. Demgegenüber lassen sich andere humanpathogene Filarien der *Brugia*-Art sowie die Tierfamilie *Litomosoides* gut im Tiermodell untersuchen [14]. Auch *Brugia pahangi*, eine Filarienart, welche ausschließlich Tiere wie Nager oder Katzen als Endwirt

nutzt, erscheint zum Studium der lymphatischen Filariose geeignet [15]. Zu den am besten untersuchten Tiermodellen gehört *L. sigmodontis*, da es einen zu den Erregern humaner lymphatischer Filariosen vergleichbaren Entwicklungszyklus aufweist, der alle Larvenstadien und die juvenilen sowie die adulten männlichen und weiblichen Filarien umfaßt [16]. Daher wird dieser Filarienvertreter auch als Testsystem für die Wirkung filarizider Medikamente genutzt [17], deren Effizienz bzgl. der Elimination der Mikrofilarien von *L. sigmodontis*, *A. viteae*, *B. malayi* und *B. pahangi* in infizierten Nagern der Art *Mastomys coucha* beschrieben wird [18].

Die adulten Filarien von *L. sigmodontis* haben eine Länge von ca. 10cm beim Weibchen bzw. 4cm beim Männchen und einen Durchmesser von ca. 1mm. Sie parasitieren in der Pleurahöhle des Endwirts. Als natürlicher Endwirt dient die Baumwollratte *Sigmodon hispidus*. In Simulation des Zwischenwirts der humanpathogenen Filariosen dient hier als Überträger der infektiösen Larve (L3) eine Milbe (*Ornithonyssus bacoti*, synonym: *Liponyssus bacoti* und *Bdellonyssus bacoti*) [19]. Die adulten Weibchen setzen pro Tag zwischen 20.000 und 30.000 Mikrofilarien frei [20-22]. Eine *in vitro*-Haltung adulter Filarien oder einzelner Stadien könnte der Entwicklung filarizider Medikamente dienlich sein, ist aber bislang an der begrenzten Lebensdauer der Parasiten außerhalb seines Endwirts gescheitert [23-30]

I.1.4 Evasionsstrategien

Bislang gibt es eine Vielzahl von Beobachtungen und Annahmen, die zu erklären versuchen, wie der Parasit es schafft, dem Immunsystem des Wirts zu entkommen. Mikrofilarien sind in der Lage, durch die Plazenta in den Embryo zu wandern. Weiterhin werden Filarienantigene mit der Muttermilch auf den Säugling übertragen, so daß bereits im Uterus oder kurz nach der Geburt eine verminderte Reaktionsbereitschaft gegen Parasiten durch klonale Deletion reaktiver T-Zellen eingeleitet wird. Filarienantigene wirken direkt immunsupprimierend, wobei Antigene, wie z.B. das Phosphorylcholin, eine selektive Anergie gegen andere Filarienantigene induzieren [31-37]. Wie Hintz et al. zeigen konnte, existieren auch Antigene mit Phosphorylcholin-Homologen wie Dimethylaminoethanol (DMAE) [38], die möglicherweise ähnliche Effekte aufweisen könnten. Der Komplex aus T-Zellrezeptor (TCR) und Ligand (CD3) wird als ein wichtiger Regulationsfaktor für die Zytokinproduktion und die Proliferationsreaktion bestimmter T-Zellklone

angesehen [8]. Somit könnten die Prozessierung und die Präsentation von Antigenen für das zelluläre Reaktionsverhalten und das Zytokinprofil bei Filariosen von entscheidender Bedeutung sein.

Einzelnen Entwicklungsstadien der Filarien gelingt es, durch Variation von Oberflächenstrukturen der Immunabwehr zu entgehen. Apfel et al. zeigte, daß sich bei der Häutung von L3 zu L4 bei *A. viteae* sowohl die Proteine als auch die Lipid- und Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche verändern [39]. Bei *O. volvulus* wurde beobachtet, daß die anfängliche ADCC-Reaktion gegen Larven 3 mit Entwicklung zu L4 nicht mehr stattfand [12]. Eine weitere Möglichkeit zur Maskierung besteht in der chemischen Variation der Oligosaccharidstrukturen der Oberflächenproteine. Bisher wurde überwiegend bei Trematoden eine beträchtliche Anzahl dieser Strukturvariationen gefunden, die sowohl auf *N*-glykosidisch als auch teilweise *O*-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden nachgewiesen wurden. Diese Strukturen sind z.T. in der Lage, ganz allgemein Autoimmunreaktionen gegen neutrophile Zellen auszulösen, welche das gleiche Epitop tragen, und somit bei der Schistosomiasis für die beobachtete Neutropenie mit verantwortlich zu sein scheinen [40-44].

Außerdem werden von Filarien exkretorisch-sekretorische (ES) Produkte in das umgebende Milieu abgegeben. Diese immunogen wirkenden Substanzen können z. B. Effektorzellen auf Distanz halten und von ihrem eigentlichen Ziel ablenken. Bei einem ES-Produkt aus *Toxocara* -Larven wurden zwei ungewöhnlich kurze *O*-Glykane isoliert, die aus einem einfach bzw. zweifach methylierten Trisaccharid bestehen [45]. Filarien produzieren aber auch Enzyme, z.B. Katalase, Cu/Zn-Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase, welche die toxischen Sauerstoffradikale aktivierter Effektorzellen neutralisieren können. Mikrofilarien von *B. malayi* und *W. bancrofti* sezernieren immunsupprimierend und antiinflammatorisch wirkende Prostaglandine (PGE₂), außerdem Prostacyclin, das eine Thrombozytenaggregation verhindert [46] und Monozyten-Makrophagen-Wanderungsinhibitionsfaktoren (MMIF) [47].

Ein weiterer Schutz vor dem Immunsystem ist, daß Filarien wie *W. bancrofti*, *Brugia* spp. und *L. sigmodontis* bescheidete Mikrofilarien im Stadium L1 hervorbringen, deren Zusammensetzung von Bardehle und Hintz aufgeklärt wurde (s. II.2.4). Molekulare Mimikry, der Einbau wirtseige-

ner Strukturen, ist ebenfalls ein wirksamer Schutz des Parasiten vor der Immunabwehr. Darüber hinaus maskieren ebenso wie Trematoden auch Nematoden ihre Oberfläche mit wirtseigenem Serumalbumin [48].

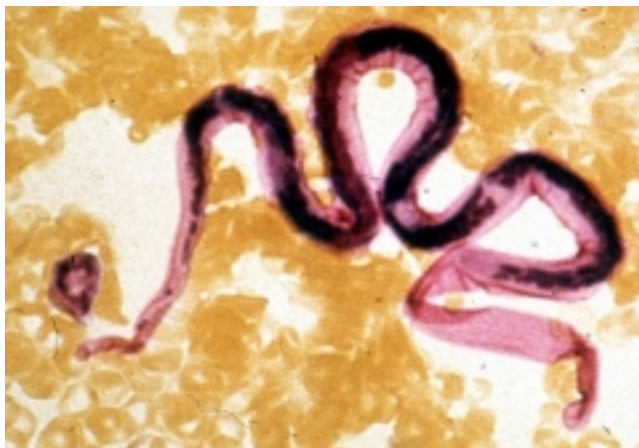
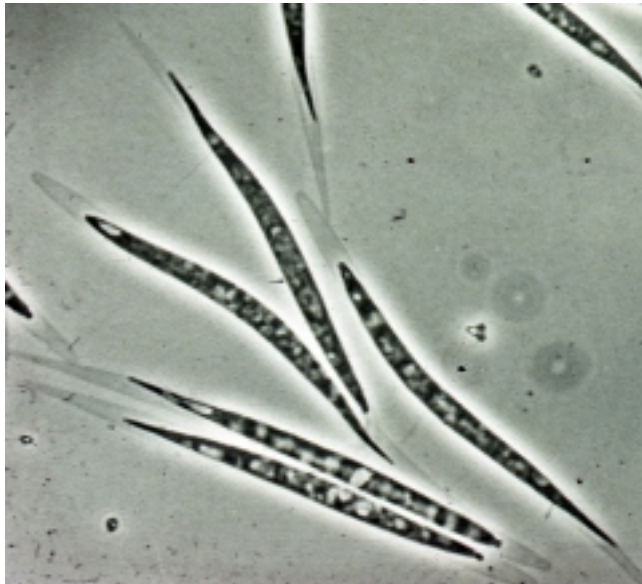


Abb. 4: Oben, Mikrofilarien von *L. sigmodontis* im Phasenkontrastmikroskop.

Unten, Mikrofilarie von *B. malayi* im Blutausstrich nach Giemsafärbung [49]

I.1 Die Scheide der Mikrofilarien

Ausschließlich die Erreger der lymphatischen Filarose setzen gescheidete Mikrofilarien (L1) frei. Die Scheide ist eine flexible, die Mikrofilarie allseitig umschließende, lose Hülle und stellt wegen ihrer Undurchlässigkeit für Antikörper die eigentliche Interaktionsfläche zwischen der Larve 1 und dem Immunsystem des Wirts dar.

I.2.1 Genese, Morphologie und Ultrastruktur

Die Scheide besteht aus zwei Schichten, der Basis- und der Partikelschicht, die jeweils unterschiedlicher Herkunft sind. Die Genese und Ultrastruktur der Scheiden von *L. sigmodontis* und *B. malayi* sind weitgehend homolog. Die innen liegende Basisschicht entsteht aus der Eihülle, die in der Embryonalentwicklung der Mikrofilarie zunächst auf eine Dicke von ca. 20 bzw. 35 nm anwächst. Durch Streckung der Mikrofilarie wird sie, vermutlich durch Dehnung, auf ca. 2-3 bzw. 7 nm ausgedünnt. In der späten Reifungsphase (s. Abb. 5) wird von Uterusepithelzellen sezerniertes Material auf die Basisschicht aufgelagert und somit die Partikelschicht gebildet (uterine Schicht). Sie erscheint perlenkettenartig mit einer „Perlendicke“ von ca. 40-80 nm [50].

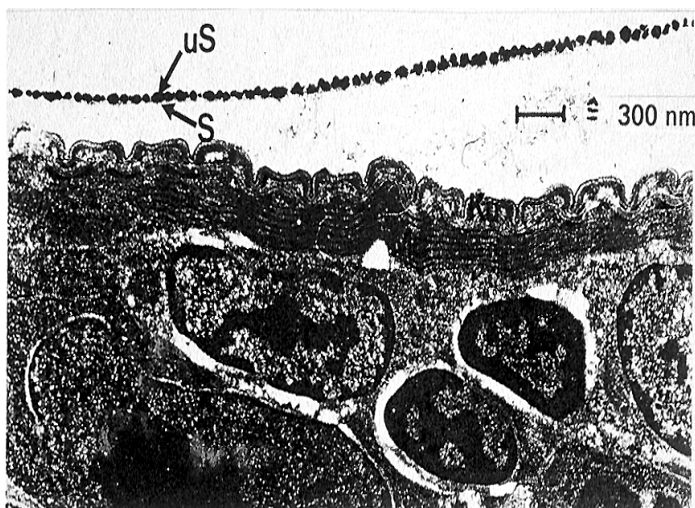


Abb. 5: Reife Mikrofilarie mit stark ausgedünnter Scheide (S) und aufgelagerter uteriner Schicht (uS) [50]

I.2.2 Histochemische Untersuchungen

Allen angeführten Untersuchungen liegt die Beobachtung zugrunde, daß die Mikrofilarienscheide generell eine polyanionische Oberfläche besitzt, mit Eigenschaften, die auf Kohlenhydrate hinweisen. Wie Simpson et al. folgerten, sollen die Mikrofilarienscheiden von *B. pahangi* und *B. patei* sulfatierte Proteoglykane enthalten [51]. Weiterhin wurden bei *B. pahangi*, *B. patei*, *L. loa* und *W. bancrofti* periodatsensitive Proteoglykane, sulfatierte Polymere, Schwefelproteine und komplexe Lipide postuliert, wobei der polyanionische Charakter nach Neuraminidase- oder Hyaluronidase-Behandlung erhalten blieb. Die Anwesenheit sulfatierter Kohlenhydrate wurde ebenfalls durch die positive Färbung mit Ruthenium-Rot und Lanthanhydroxid bestätigt [52,53]. Demgegenüber wurden bei *W. bancrofti* keinerlei vicinale OH-Gruppen gefunden, die als Indikator für Kohlenhydrate gelten könnten, während kationisiertes Ferritin an der polyanionischen Oberfläche gebunden wurde [54].

I.2.3 Lektinbindungsstudien

Die Ergebnisse der Lektinbindungsstudien sind recht uneinheitlich. Generell läßt sich aber sagen, daß sich *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) fluoreszenzmikroskopisch nachweisen, aber elektronenoptisch nicht bestätigen läßt. GlcNAc konnte sowohl bei *B. pahangi*, *W. bancrofti*, *L. sigmodontis* als auch *B. malayi* nachgewiesen werden [55-58]. Fuhrmann und Piessens schlossen aus Studien mit *B. malayi* auf die Anwesenheit von Chitin, jedoch konnte goldmarkiertes GlcNAc-spezifisches Lektin (WGA) nicht an *B. malayi* und *L. sigmodontis* binden [59].

I.2.4 Isolierung und biochemische Analysen

Für die chemische Analyse der Mikrofilarienscheiden von *L. sigmodontis* und *B. malayi* wurde von Bardehle et al. und Klonisch et al. eine Methode zur Isolierung reinen Scheidenmaterials entwickelt (s. II.1) [60], das die Grundlage aller nachfolgenden Untersuchungen darstellt.

Die Arbeiten von Bardehle et al. ergaben eine chemische Zusammensetzung der Mikrofilarienscheide von 55 Gewichts-% Aminosäuren (Protein) und ca. 11% anorganischen Bestand-

teilen, besonders Phosphat - neben wenig Kohlenhydraten (8 Gewichts-%) [61]. Darunter wurden *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) und Uronsäuren im Verhältnis 1:1 gefunden, was auf die Anwesenheit von glykosaminoglykanähnlichen Strukturen zurückgeführt wurde. Außerdem wurde ein Scheidenprotein ansequenziert (shp1), kloniert und immunhistologisch im basalen Bereich der Scheide lokalisiert [62-64]. Durch die Arbeiten von Hintz et al. ließen sich noch fünf weitere Scheidenproteine isolieren und identifizieren [65,66]. Auf Grund dieser Daten war ein erstes Modell über den Aufbau der Mikrofilarienscheide möglich. So konnte mit Seren infizierter Mäuse gezeigt werden, daß shp3 und shp3a die dominanten Polypeptide der Scheidenoberfläche sind [67]. Ein Sequenzvergleich weist sie als mucinähnlich aus, mit charakteristischen serin- und threoninreichen Wiederholungsmotiven, die – wie die Arbeiten von Hintz ergaben – hochgradig mit DMAE, einem biogenen Amin und *N*-Acetylgalactosamin modifiziert sind [65].

Scheidenpoly-peptid*	Molekülmasse/ kDa			Resultierende ptMs***	Mol-% DMAE	Mol/Mol GalN
	SDS- PAGE cDNA	MS**	aus			
shp1	25	12.9	11.8	1.3	-	ca. 4
shp1a	28	11.1	8.7	2.4	-	n.b. ^a
shp3	120	(220/110)?	25.2	?	ca.60 (430)	ca. 6 (43) ^b
shp3a	40	45		33.7	ca.50 (110)	ca. 5 (11)
	11.3					
shp4				8.7	-	n.b. ^a
	34	21.5	12.8			

*carboxymethyliert **MALDI-TOF-MS ***posttranslationale Modifikationen

^a nicht bestimmt ^b Teilchenzahl bezogen auf die Masse 220 bzw.110kDa

Tab.1: Übersicht über einige Daten der Scheidenproteine shp1- shp4

Wie aus der Tabelle hervorgeht, weisen alle Scheidenproteine posttranslationale Modifikationen auf, wobei die Oberflächenproteine shp3 und 3a selektiv mit DMAE modifiziert sind. Bisher konnten weder die zur Klärung der Gesamtmasse an Modifikationen ausstehenden Bestandteile noch die Verknüpfungsart des Bausteins DMAE mit dem Polypeptid bestimmt werden. Die Anwesenheit von GalNAc in allen shps läßt jedoch darauf schließen, daß *O*-Glykosylierung einen wesentlichen Anteil der Modifikationen ausmacht.

I.2.5 Modifikationen

I.2.5.1 ϵ -(γ -Glutamyl)-Lysin

Aus Versuchen mit Inhibitoren konnte in adulten Mikrofilarien von *B. malayi* Transglutaminaseaktivität nachgewiesen werden, welche kovalente ϵ -(γ -Glutamyl)-Lysin-Isodipeptidbindungen zwischen Proteinen knüpft [68]. Dieser Quervernetzungstyp wurde für die Schwerlöslichkeit der Scheide in SDS/2-Mercaptoethanol diskutiert, und das Enzym wurde isoliert und charakterisiert [69].

I.2.5.2 Glykosylierung

Zur näheren Erläuterung der Modifizierung von Proteinen durch Oligosaccharide sollen im folgenden deren Synthese und die Mechanismen der *N*- und der *O*-Glykosylierung kurz zusammengefaßt werden. Eine grafische Darstellung über den generellen Biosyntheseweg der Glykosylierung eines Proteins in der Zelle gibt Abb. 6. Glykoproteine werden an den membrangebundenen Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) synthetisiert. Während der Synthese werden sie ins Lumen des RER verlagert, wo sie entweder an der Membran gebunden bleiben oder abgelöst werden, je nach Bestimmung (Zelloberfläche oder Sekretion). Die Biosynthese der *N*- und der *O*-Glykane ist zwar sehr unterschiedlich, jedoch läßt sich generell sagen, daß die Glykosylierung während oder nach der Proteinbiosynthese (Translation) im RER beginnt. Danach werden die Glykoproteine mittels umhüllender Vesikel zum Golgi transportiert, in dem die Prozessierung und letztendliche Glykosylierung vervollständigt wird. Vom Golgi werden Plasmamembran- und sekretorische Glykoproteine zur Zelloberfläche sowie lysosomale Enzyme zu den Lysosomen transportiert.

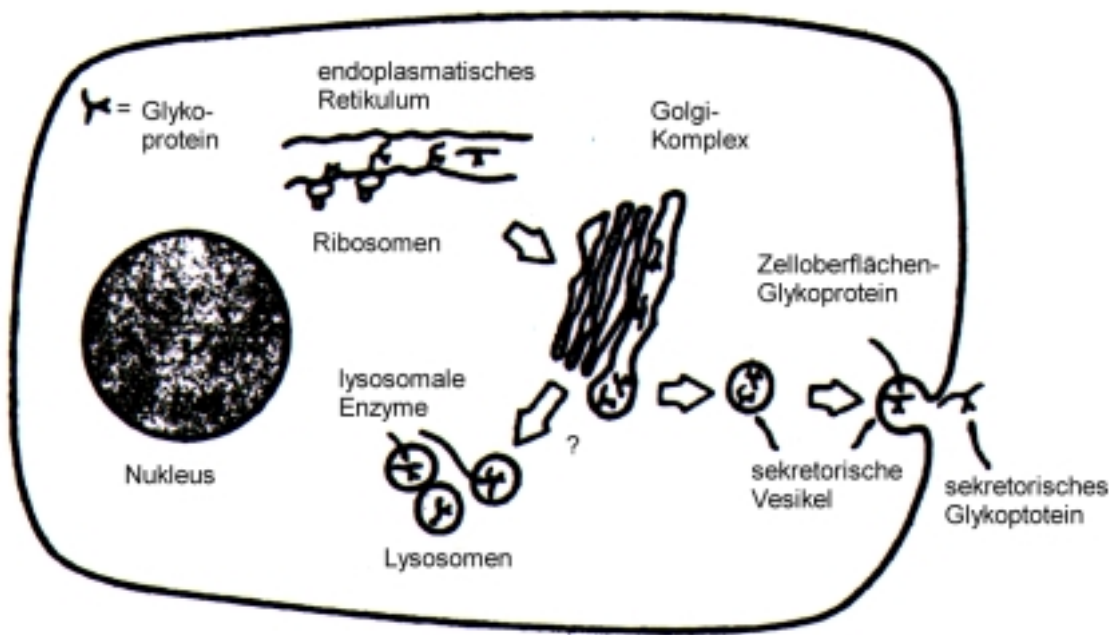


Abb. 6: Subzelluläre Lokalisation der Oligosaccharidbiosynthese

I.2.5.2.1 N-Glykosylierung

Die post- oder kotranslational ablaufende Biosynthese *N*-glykosidischer Oligosaccharide in Glykoproteinen kann allgemein in zwei Stadien unterteilt werden [70-81]. *N*-glykosidische Oligosaccharide werden aus einer lipidgebundenen Vorstufe, die aus drei Glucose-, neun Mannose- und zwei GlcNAc-Resten besteht [82,83], komplett auf die wachsende Polypeptidkette im RER auf Asparagin übertragen [84-86]. Das für eine Glykosylierung verwendete Sequon im Polypeptid besteht aus Asn-X-Ser/Thr, wobei X eine beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann [87,88]. Eine weitere Voraussetzung für die Glykosylierung ist eine für die Glykosyltransferasen zugängliche Sekundärstruktur. Dieses über Asparagin verknüpfte Glykoprotein-Oligosaccharid wird bereits im RER durch Glucosidasen und die ER-Mannosidase abgebaut und dann – in Vesikel verpackt - zum Golgi transportiert [88,89]. Das so „getrimmte“ Oligosaccharid kann dort unter Bildung von mannosereichen, hybriden oder Polylactosamin-Strukturen weiter prozessiert werden (s. Abb. 7). Die gemeinsame Kernstruktur der *N*-Glykane besteht aus: β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc – Asn

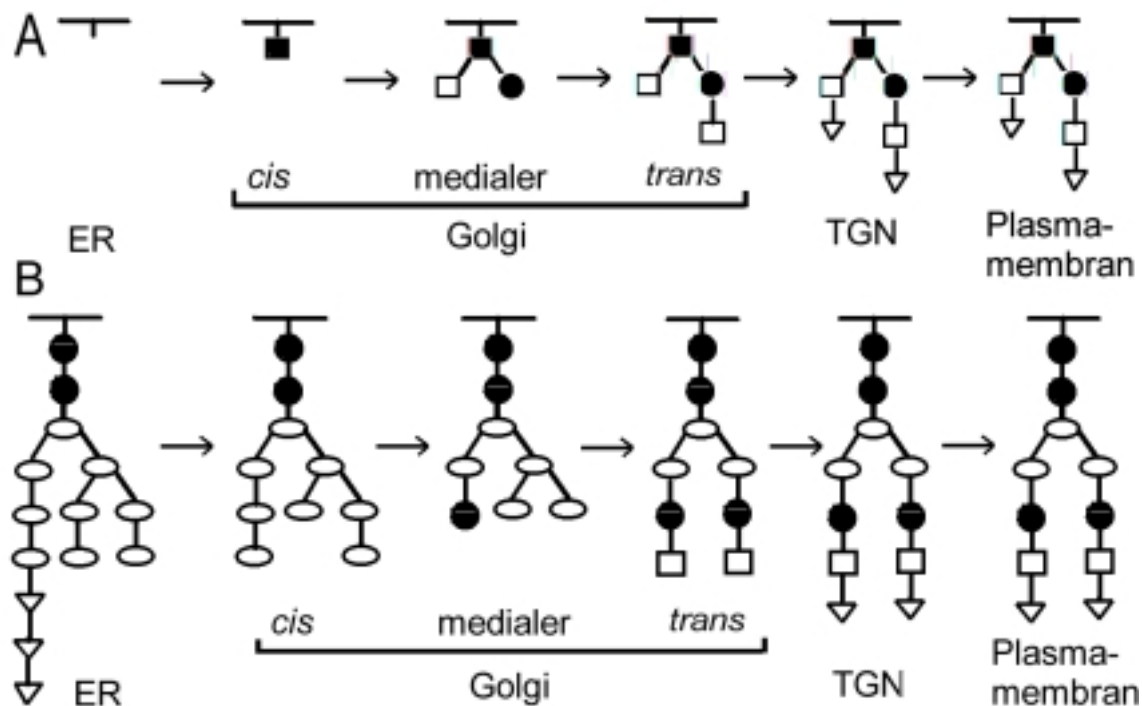


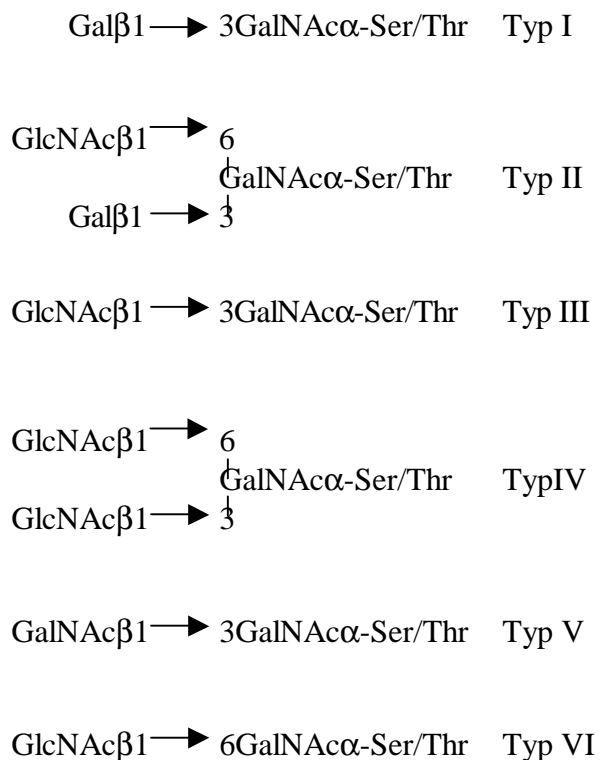
Abb. 7: Vereinfachtes Modell des Biosyntheseweges eines *O*-glykosidisch gebundenen Disialotetrasaccharids (A) und der Vergleich zur *N*-Glykosylierung (B). Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur einige Intermediate des *N*-Glykosylierungsweges gezeigt. Schwarze Quadrate: GalNAc, weiße Quadrate: Gal, schwarze Kreise: GlcNAc, weiße Ellipsen: Mannose, weiße Dreiecke: Sialinsäure

I.2.5.2.2 *O*-Glykosylierung

Im Gegensatz zu den *N*-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden verläuft die *O*-Glykosylierung posttranslational im ER oder *cis*-Golgi durch die schrittweise Übertragung von nukleotidaktivierten Monosacchariden mit Hilfe entsprechender Glykosyltransferasen [90]. Dabei stellt das jeweils gebildete Produkt das Substrat für den nächsten enzymatischen Transfer dar, so daß die Konzentration und die Aktivität der einzelnen Transferasen über den Aufbau bestimmter Strukturen entscheiden. Im ersten Schritt wird ein GalNAc-Rest (aus UDP-GalNAc) auf die Hydroxylgruppe eines Serins oder Threonins übertragen. Ein definiertes *O*-Glykosylye-

rungsmotiv wie bei *N*-Glykanen ist bisher nicht bekannt, jedoch zeigen Studien, daß durch Prolin flankierte serin- und threoninreiche Proteinregionen aufgrund der Bildung von sog. „ β -turns“ begünstigt sind, welche die Zugänglichkeit für die GalNAc-Transferase erleichtern. Weitere Substitutionen durch Gal/GlcNAc β 3 und/oder GlcNAc β 6 können folgen [89-96]. Die Biosynthese kann terminiert werden durch Transfer von Sialinsäure, Fucose und/oder Sulfat. Tab. 2 gibt einen Überblick über bisher gefundene Kernstrukturen.

Im Gegensatz zu den *N*- weisen *O*-glykosidisch substituierte Glykoproteine also mehrere Kernstrukturen auf, die bis auf wenige Ausnahmen alle mit α -GalNAc an Serin/Threonin geknüpft beginnen [86]. Daneben kommen auch noch Proteoglykane mit *O*-Xylosyl-Serin(Threonin) [86,97], Kollagen mit *O*-Galactosyl-Hydroxylysin [86] und Kernporenproteine mit *O*-*N*-Acetylglucosaminy-Serin als Verknüpfung vor [88].



Tab. 2: Es gibt mindestens sechs Kernstrukturen (Typ I-VI) in *O*-glykosidisch substituierten Glykoproteinen. Sie beginnen in der Regel am aglykonischen Ende mit einem α -GalNAc-Rest

I.2 Aufgabenstellung

Aus den bisherigen Analysedaten ergeben sich folgende Aufgaben:

- Zur Untersuchung auf Glykosaminoglykane und Teichonsäuren sollen möglichst sensitive mikroanalytische Methoden bzgl. Glycerol, Uronsäuren und Cholin erarbeitet werden.
- Es sollen die Strukturen der *O*-Glykane in den Mikrofilarienscheiden von *L. sigmodontis* analysiert und charakterisiert werden. Ferner sollen am isolierten Oberflächenprotein shp3a die zur Klärung der Gesamtmasse der Modifikationen noch fehlenden Bestandteile identifiziert werden. Auch hier sollen neue mikroanalytische Methoden, z.B. die der MALDI-TOF-Massenspektrometrie sowie der HPLC etabliert werden.
- Der Baustein DMAE und seine Verknüpfung im Fmoc-Derivat soll mit Hilfe der Protonen-Kernresonanzspektroskopie (^1H -NMR) strukturell aufgeklärt werden.
- Zwecks Gewinnung eines Antiserums gegen den Baustein DMAE sollen im Rahmen einer chemischen Synthese geeignete Hapten-Kopplungsmethoden für ein DMAE-tragendes Epitop erarbeitet und mit den im Hause verfügbaren Methoden charakterisiert werden.

I Material und Methoden

I.1 Gewinnung von Mikrofilarienscheiden

Die Gewinnung mikrofilarienhaltigen Blutes mit Hilfe des in I.1.1 beschriebenen, aufrechterhaltenen Infektionszyklus wurde durch das Institut für Parasitologie der Universität Gießen (AG Zahner) gewährleistet.

Je nach Präparation wurden 10-15ml mikrofilarienhaltigen Bluts aus mit *Litomosoides sigmodontis* infizierten Mäusen in einem verschraubbaren 50ml Kunststoffzentrifugenröhrchen (NALGENE) geliefert und mit einer 46%-igen (m/v) Percoll-NaCl-Lösung der Dichte 1.061g/ml versetzt (SIGMA) und auf 25ml aufgefüllt. Nach Verschließen wurde ca. 60min bei 1000 x g zentrifugiert (Labofuge 6000, HERAEUS, Hanau). Die in einer deutlich sichtbar trüben Schicht aufkonzentrierten Mikrofilarien wurden abpipettiert und zum Waschen in einem neuen 50ml Kunststoffzentrifugenröhrchen mit azid-haltigem PBS¹⁾ auf 50ml aufgefüllt, gefolgt von 10min Sedimentation bei 1000 x g. Der Überstand wurde bis auf etwa 5ml mit einer wasserstrahlbetriebenen Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Die nunmehr dicht suspendierten Mikrofilarien wurden im Zentrifugenröhrchen durch schnelles Rotieren an einem Drehmotor in flüssigem Stickstoff als dünne Schicht an der Röhrchenwand schockgefroren und danach 20 Male abwechselnd auf 0°C aufgetaut und wieder schockartig gefroren. Eine grobe Vorreinigung dieses Gemenges wurde mittels fünfmaligen Zentrifugierens für 10-20s bei 2500 x g vorgenommen. Bei diesem Prozeß sedimentierten vorwiegend die Mikrofilarienkörper bzw. deren Trümmer, und der scheidenhaltige Überstand wurde jeweils vorsichtig abpipettiert und auf einem 5µm PTFE-Siebfilter eingeeengt (SARTORIUS, Göttingen); dabei sammelten sich die Mikrofilarienscheiden im Filtrat. Die Ultrafiltrationszelle (0.4ml, AMICON, Witten) wurde mit einem Filtrationsdruck von ca. 1bar betrieben. Anschließend wurde mit azid-haltigem PBS solange gewaschen, bis das Filtrat 50ml enthielt. Nach Sedimentation der Scheiden bei 5.500 x g für 10min wurde nunmehr durch ein 2µm-Siebfilter im gleichen Gerät filtriert und mit PBS gewaschen, bis erneut 50ml Filtrat entstanden. Das Filtrat wurde wie nach der ersten Filtration sedimentiert, das Sediment in 5ml azid-haltigem PBS suspendiert und in einem 5ml Gefrier Röhrchen (NALGENE) in flüssigem Stickstoff gelagert [60].

¹⁾ 8g NaCl, 0.2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄·xH₂O, 0.2g KH₂PO₄, 0.5gNaN₃ auf 1000 ml Wasser

Die Reinheitskontrolle erfolgte anhand dreier Kriterien:

- ◆ Untersuchung des Filtrats auf evtl. vorhandene Mikrofilarienkörper im Phasenkontrastmikroskop
- ◆ Untersuchung des Bandenmusters aufgeschlossener Scheiden in der SDS-PAGE (s. II.4)
- ◆ Aminosäureanalyse (Gasphasenhydrolyse, s. II.3), bei der sich bei reinem Material ein Aminosäureprofil mit ca. 35Mol% Glutamat bzw. Prolin ergeben sollte

Das reine Scheidenmaterial befand sich im Filtrat und wurde in einem 4.5ml Kunststoffröhrchen in Flüssigstickstoff aufbewahrt.

II.2 Isolierung einzelner Scheidenproteine [65]

Das nach II.1 isolierte, reine Scheidenmaterial (ca. 1mg Proteinanteil) wurde in 2 Portionen zu je 500µg Protein pro Kunststoffmikroreaktionsgefäß (EPPENDORF) aufgeteilt, jeweils 30min bei 10000 x g sedimentiert und einmal durch Waschen mit 1ml Wasser von PBS befreit. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurden zu beiden Ansätzen jeweils 50µl ausschließlich Natriumionen enthaltendes PBS gegeben, um die Bildung eines schwerlöslichen Kalium-SDS-Niederschlags während der späteren Extraktion zu vermeiden. Danach wurden 400µl Denaturierungslösung (6M Guanidinhydrochlorid, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3; 1mM EDTA, 12.5µM Dithiothreitol) schnell hinzupipettiert, das Material ausgiebig suspendiert und nach Überschichten mit Argon 2h bei 37°C und 15min bei 100°C inkubiert. Die Alkylierung der freigesetzten Sulfhydryl-Gruppen erfolgte durch Zugabe von 55µl frisch bereiteter α -Iodessigsäure (SIGMA, 200mM in Denaturierungslösung ohne Dithiothreitol, pH 8.3, mit konz. NaOH eingestellt) und durch Inkubation für ca. 2h bei 37°C im Dunkeln unter Argon. Durch Zugabe von 2µl β -Mercaptoethanol (BIORAD) wurde die Reaktion gestoppt. Zur Entfernung gröberer Partikel wurde eine Filtration über 5µm Filtrationseinheiten (MILLIPORE) durchgeführt, welche zugleich den unlöslichen Anteil des Scheidenmaterials, der überwiegend aus dem quervernetzten shp2 bestand, von den löslichen Proteinen trennte. Das Filtrat wurde noch jeweils zweimal 30min bei 10.000 x g zentrifugiert, dessen Sediment bei 100°C mit 410µl Tris-HCl-Lösung (pH 8.5, 0.02%SDS) extrahiert und einmal 1h bei 100°C

mit Ultraschall behandelt. Nach jeder Extraktion erfolgte eine erneute Filtration über 5µm-Filter. Der Überstand nach jeder Zentrifugation wurde jeweils über 10.000Da-Filtrationseinheiten gegeben zur Aufkonzentration des löslichen Anteils (Ultrafree-MC, MILLIPORE). Alle Filtrate der Extraktionen wurden in einer 10.000Da-Filtrationseinheit vereinigt bzw. alle Filtrierrückstände in einer 5µm-Filtrationseinheit gesammelt und mit 200µl Tris-HCl (pH 8.5, 0.02% SDS) aufgenommen.

Die erste Fraktionierung des löslichen Anteils von 500µg Scheidenmaterial erfolgte mittels Gelfiltrations-HPLC (Geräte s. II.3 Normal-HPLC). Es wurde eine Diol-Säule (GF-250, ZORBAX, Bio Series) verwendet unter isokratischen Bedingungen mit einem 0.16M Phosphatpuffer (pH 7, 20% Acetonitril) als Eluenten, 1ml/min Flußrate. Während der Auftrennung – 200µl pro Injektion – wurden reproduzierbar stets vier Fraktionen zu je 0.6-1.2ml in jeweils einem 5ml Schliffgläschen mit Spitzboden unter Eiskühlung gesammelt und anschließend bei –20°C gelagert. Die Subfraktionierung erfolgte über reverse-phase-HPLC unter Verwendung einer 2.1x250mm Säule (C4 Phase, Vydac 300, MZ-ANALYSENTECHNIK, Mainz) mit den Eluenten A: 0.11% TFA (v/v) in Wasser, B: 0.08% TFA (v/v) in Acetonitril; Gradient: 0% B auf 100% B in 45min, Geräte s. II.3 Narrowbore HPLC.

II.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Normal-HPLC (Säuleninnendurchmesser ≥ 4mm)

Die Analysen und präparativen Reinigungsschritte zur Isolierung von Scheidenkomponenten durch reverse-phase bzw. Gelfiltrationschromatographie erfolgten mit zwei HPLC-Anlagen, die im Hause unterhalten wurden. Für die Aminosäureanalytik und die präparative Vorfraktionierung einzelner Scheidenproteine wurde eine Anlage von GYNKOTEK (Germering) verwendet: Ternärer Gradientenformer Modell 250B, Hochdruckpumpe Modell 300C, RHEODYNE NZ 190 Einspritzventil, Säulenthmostat STH 585, UV-Detektor SP6, Fluoreszenzdetektor RF 1001, Spannungsschreiber (Servogor S, BROWN BOVERI, METRAWATT GmbH, Mannheim), Integrator-Software: Int450 (KONTRON)

„narrow bore“-HPLC (Säuleninnendurchmesser ≤ 2.1mm)

Hierfür wurde eine Anlage von APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt) verwendet: Hochdruck-

Spritzendoppelkolbenpumpe 140B, Rheodyne 7125 Einspritzventil, UV-Detektor 785 A, Fluoreszenzdetektor 980 mit „cut off“-System, für jeden Detektor jeweils ein Integrator C-R3A (GynkoteK, Germering).

II.4 Fmoc-Aminosäureanalytik

Zur Quantifizierung der Menge des eingesetzten Scheidenproteins bzw. Aminosäuregehalts wurden 10 µl in PBS suspendierte reine Mikrofilarien-Scheiden in einem geglühten gläsernen Hydrolyseröhrchen (50mm, 4mm I.D., MAGV) lyophilisiert und dieses zusammen mit einer Kunststoffhalterung in ein verschraubbares Polypropylen-Hydrolysegefäß (ROTH) überführt. Bei der Gasphasenhydrolyse wurden ca. 5ml 6M Salzsäure auf dem Gefäßboden vorgelegt und mit Argon entgast. Bei der Flüssigphasenhydrolyse wurde soviel Salzsäure vorgelegt, daß der Boden der Hydrolyseröhrchen darin eintauchte. Zusätzlich wurden 30 µl Salzsäure auf das lyophilisierte Material im Röhrchen pipettiert. Das Polypropylengefäß wurde mit Argon befüllt, dann mit den darin befindlichen Glasröhrchen fest verschlossen und in einem Inkubationsofen bei 110°C für 10 bzw. 24h erhitzt.

In einer Rotationsvakuumpumpe (JOUAN, Unterhaching) wurde die überschüssige Salzsäure abgedampft und die Probe mit einem entsprechenden Aliquot einer 0.5M Boratlösung (pH 7.7) versetzt. Derivatisierung erfolgte durch Zugabe einer 25mM Fmoc-Lösung in Aceton. Überschüssiges Fmoc-Reagenz wurde nach 10min Reaktionszeit bei Raumtemperatur durch Zugabe einer 0.24M Adamantan-Hydrochloridlösung in Wasser abgefangen (Serva, Heidelberg). Dabei wurde jeweils ein Volumenverhältnis von 1:1:0.1 Probe zu Fmoc zu Adamantan-HCl eingehalten. Die bei der Aminosäureanalyse benötigte Mindestmenge beträgt ca. 40ng Protein bzw. 20ng Peptid [87,98-100]. Jeweils 10 µl der mit Fmoc derivatisierten Lösung wurden mit Hilfe einer reverse-phase-Säule chromatographisch aufgetrennt und fluorimetrisch detektiert. Geräte s. II.3 Normal-HPLC. Trennsäule: 4x250mm, Superspher 100, C18 Phase endcapped (MERCK). Eluent A: 20mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 2.2mM Tetraethylammoniumhydrogensulfat, mit Phosphorsäure auf pH 2.8 eingestellt; Eluent B: wie A, pH 4.5, dann 20% des Puffervolumens durch Methanol ersetzt, Eluent C: Acetonitril. Gradient: von 73% A bzw. 27% C in 27min auf 60% A bzw. 40% C, dann 90s isokratisch. Anschließend von 64% B bzw. 36% C in 19min auf 25% B bzw. 75% C, dann 15min isokratisch; Fluß 1ml/min.

II.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Separation von Mikrofilarien-Scheidenproteinen und von chemischen Syntheseprodukten (s. II.10.1.1) wurde neben der HPLC (s. II.2 u. II.3) ausschließlich die SDS-PAGE herangezogen. Das verwendete Elektrophoresegerät war von BIORAD, München (Mini-Protean-II Modell 1000/500). Dabei wurde jeweils ein 12%-iges Trenngel mit 4%-igem Sammelgel verwendet. Hierfür wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

Lösungen - A: 0.8g *N,N*-Methylenbisacrylamid in 100ml Acrylamid (30%)

B: Tris-(hydroxyethyl)-aminomethan/HCl (36.3g in 100ml H₂O, pH 8.8)

C: wie B (6g in 100ml H₂O, pH 6.8)

D: 15g Tris-(hydroxyethyl)-aminomethan, 72g Glycin in 500ml H₂O

E: 100µl SDS (10% w/v)

F: (NH₄)₂S₂O₈ (10% w/v)

G: *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin

Pipettierschema:

Trenngel: 4ml A + 2.5ml B + 3.35ml H₂O + 100µl E + 50µl F + 5µl G

Sammelgel: 1.3ml A + 2.5ml C + 6.1ml H₂O + 100µl E + 50µl F + 10µl G

Nach beendeter Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel aufgetragen. Das fertige Gel hatte eine Dicke von 0.75mm. Die zur elektrophoretischen Trennung nötige Stromzufuhr wurde jeweils 15min bei 100V und ca. 70min bei 150V gehalten.

II.6 Färbemethoden

II.6.1 Silberfärbung [101]

SDS-Polyacrylamidgele wurden in einem lichtundurchlässigen Gefäß mit 200ml einer wäßrigen Lösung aus 50% Methanol, 10% Essigsäure für ca. 2h fixiert, danach über Nacht mit Wasser gewaschen. Es folgte dreimaliges Waschen mit 50% Methanol (v/v) für je 10min und eine Vorbehandlung mit 0.8mM Natriumthiosulfatlösung sowie dreimaliges Waschen mit H₂O für jeweils 20s. Die Imprägnierung wurde mit einer 0.2%-igen (m/v) Silbernitratlösung (0.75% Formaldehyd, v/v) 10min durchgeführt. Anschließend wurde zweimal für 30s mit Wasser gewaschen und dann mit einer wäßrigen Lösung bestehend aus 566mM Natriumcarbo-

carbonat, 0.016mM Natriumthiosulfat und 0.05% (v/v) Formaldehyd für 3min entwickelt. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser für 30s wurde das Gel mit einer 50mM EDTA-Lösung für 10min behandelt und die Färbung durch Abgießen der Flüssigkeit gestoppt, anschließend erneut mit Wasser gewaschen.

II.6.2 Coomassie

Als Färbelösung wurden 0.05g Coomassie „brilliant blue“ R250 (Serva, Heidelberg) in 50ml einer Mischung bestehend aus Methanol, Essigsäure, Wasser (40:10:50; v/v) gelöst. Die Entfärbelösung enthielt keinen Coomassiefarbstoff. Die Gele wurden ca. 10-30min gefärbt und anschließend ca. 1h entfärbt.

II.6.3 Stains-All®-Färbung [102]

Hierzu wurde eine Stammlösung hergestellt, die 1g Stains-All (ICN) pro Liter Formamid enthielt und lichtgeschützt aufbewahrt wurde. Die wäßrige Färbelösung bestand aus 75ml Tris-(hydroxyethyl)-aminomethan/HCl, pH 8.8, 25% 2-Propanol (v/v), 5% Formamid (v/v) und 50ml Stammlösung. Die Gele wurden in lichtgeschützten Gefäßen behandelt und ca. 1h mit der in II.6.1.1 erwähnten Lösung fixiert und zweimal kurz mit Wasser gewaschen. Danach wurde über Nacht mit Färbelösung behandelt und ca. 10-30min mit Wasser entfärbt.

II.7 Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations – Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Zur Massenbestimmung isolierter Proteine, Peptide, Kohlenhydrate sowie Neokonjugate wurde ein Vision 2000-Gerät verwendet (FINNIGAN MAT, Bremen), das sowohl mit einem Reflektor als auch einem linearen Flugrohr ausgestattet ist. Für eine Messung wurde generell 1µl gelöstes Analysenmaterial (0.1% TFA, 75:25 Wasser:Acetonitril; v/v) mit 1µl DHBs-Lösung gemischt, welche aus 20mg 2,5-Dihydroxybenzoesäure (Gentisinsäure) und 2mg 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure - in 0.1% TFA und 50:50 Wasser:Acetonitril (v/v) gelöst -, bestand. Beim Eintrocknen der Mischung kokristallisiert die Probe mit diesen organischen Säuren und sollte idealerweise Einkristalle bilden. Das kristallisierte Gemenge wurde dann durch Stickstofflaserimpulse (3-10ns) durch Anregung bei 337nm desorbiert und gleichzeitig ionisiert. Durch ein Be-

schleunigungsspannungsfeld von 3kV wird das ionisierte Material ins Vakuum katapultiert und kann nun kräftefrei im linearen Flugrohr bzw. durch Anlegen einer Reflektorspannung im Detektor vermessen werden. Die Signalerzeugung gelingt mit einem Photoelektronendetektor. Der Vorteil dieser Art von Massenspektrometrie liegt – trotz geringerer Auflösung gegenüber der Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie (LSI-MS) – im sehr geringen Materialverbrauch, in der geringen Empfindlichkeit gegenüber Probenverunreinigungen und im weitreichenden Massenbereich bis ca. 200kDa [103].

II.8 Untersuchung auf Teichonsäure

II.8.1 Untersuchung auf Cholin

In mehreren Parallelansätzen wurden Mikrofilarienscheiden zu je 25µg bzgl. Protein aliquotiert, entsprechend einem Minimum an 0.1% Cholin, gereinigt (s. II.1) und einer modifizierten Hydrolyse nach SCHMIDT unterzogen, indem sie für 24h bei 110°C in einem Schraubverschlußgläschen mit Kunststoffdichtung mit 6M HCl unter Argon erhitzt wurden [104]. Ebenso wurden Ansätze in einem Polyethylen-Mikroreaktionsgefäß (EPPENDORF) über Nacht mit 48%(w/v) Flußsäure (HF) bei 4°C behandelt. Neben *Litomosoides* wurden ebenfalls Scheidenproben von *Brugia malayi* eingesetzt.

Nach anschließender Lyophilisation wurden die Proben mit 1ml deionisiertem Wasser aufgenommen – entsprechend einer theoretischen minimalen Menge von ca. 0.5 pmol Cholin/µl - und 30min mit einer Tischzentrifuge (HETTICH) bei 10.000 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden dann Aliquote von 40-100µl auf eine HPLC-Kationen-Austauschersäule gegeben (WHATMAN Partisphere SCX, 50µm sphärisch, 4.6x125mm I.D.; HPLC-Pumpe von GYNKOTEK Modell 300C, 143bar Säulendruck, 0.8mL Fluß, Puffer: 79mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 20mM NaH₂PO₄ x H₂O, 0.1mM EDTA und 4mM Tetramethylammoniumchlorid, pH 7.4, isokratischer Eluent).

Nach dem etablierten Verfahren von STADLER wurde dann das freigesetzte Cholin in einer Nachsäulen-Enzymreaktorkartusche (BIOMETRA, 30x12.5mm I.D.) mit immobilisierter Cholin-Oxidase quantitativ zu Betain und Wasserstoffperoxid umgesetzt, welches anschließend mit gepulster elektrochemischer Detektion an einer Platinelektrode (BIOMETRA EP 30) mit angeschlossenem Integrator gemessen wurde (Detektor: BIOMETRA PED 300;

Integrator: SHIMADZU C-R6 A Chromatopac). Als Referenzelektrode wurde eine Ag/AgCl-Elektrode eingesetzt [105]. Die Quantifizierung erfolgte durch Integration der Signale von analog präparierten Cholinstandards, mit deren Hilfe eine Kalibriergerade erstellt wurde (Cholinchlorid und DL- α -Lecithin).

II.8.2 Untersuchung auf Glycerol*

In vier parallelen Ansätzen und Kontrollen wurden jeweils 100 μ g Mikrofilarienscheidenprotein in 1.5ml-Polyethylen-Mikroreaktionsgefäßen (EPPENDORF) 30min bei 10.000 x g zentrifugiert, das Sediment einmal in 1ml deionisiertem Wasser suspendiert, erneut 30min zentrifugiert und das Wasser abgenommen. Das Sediment wurde mit ca. 50 μ l deionisiertem Wasser aufgenommen, in ein 2ml-Bördelgläschen überführt und anschließend über Silicagel im Exsikkator bei Ölpumpenvakuum getrocknet.

Nach Zugabe von 1ml 0.2M methanolischer KOH wurde das Gefäß mit einem Septum verschlossen und 1h bei 56°C erhitzt. Die Lösung wurde danach in ein Polyethylen-Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach Trockenziehen im Vakuum wurde die Probe mit ca. 30 μ l HF (48% w/v) versetzt und 24h bei 4°C belassen. Nach Entfernen der Flußsäure wurde dreimal mit je 500 μ l Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte über Na₂SO₄ getrocknet und in einer Pasteurpipette durch Glaswolle filtriert. Das Filtrat wurde sodann im Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand mit 200 μ l *N,N*-(Bis-trimethylsilyl)-trifluoracetamid (SIGMA) für 2h bei 80°C erhitzt und nach Abkühlen überschüssiges Reagenz mit Stickstoff abgeblasen.

Nach Aufnahme in einem definierten Volumen Chloroforms wurden Aliquote direkt in den Gaschromatographen injiziert (Modell 5890 HEWLETT-PACKARD, Temperaturgradient: von 55°C-220°C mit einer Aufheizrate von 10°C/s, 1min isotherm, Trägergas Helium mit 0.3 bar Säulenvordruck, Säule: Ultra-1, Methylsilicon-Beschichtung, 12m, 0.2mm I.D.).

Die Identifizierung des entstandenen trimethylsilylierten Glycerols im Gaschromatographen (GC) erfolgte über analog dargestellte Glycerolstandards und die Quantifizierung durch Integration der Signale in einem GC mit angeschlossenem Massenpektrometer (GC-MS, Modell 5970 HEWLETT-PACKARD). Die Spektren wurden mittels „electron impact“ (EI) Ionisation generiert und unter „autotune-Bedingungen“ aufgenommen.

*Die Glycerolanalysen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Moll am Forschungsinstitut Borstel durchgeführt.

Als interner Standard wurde für die Quantifizierung perdeuteriertes Glycerol verwendet, welches sich durch 5 Masseneinheiten vom nicht-deuterierten Glycerol unterschied, physikalisch jedoch identisch mit diesem ist. Die Auswertung erfolgte durch „total ion current“ (TIC) und „single ion monitoring“ (SIM).

II.9 Isolierung und Identifikation des Bausteins Dimethylaminoethanol (DMAE)

II.9.1 Präparative Gasphasenhydrolyse

Zur präparativen Isolierung von DMAE wurden mehrere, ca. 5-10µg Protein enthaltene Aliquote aus verschiedenen Scheidenpräparationen analog zu der in II.4 beschriebenen Methode der Aminosäureanalyse einer Gasphasenhydrolyse unterworfen, im Boratpuffer mit Fmoc derivatisiert und anschließend das Fmoc-DMAE-Derivat durch HPLC präparativ isoliert. Geräte: s. II.3; Chromatographiebedingungen s. II.4. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend im TFA-Acetonitrilgradienten auf derselben Säule entsalzt, gesammelt und lyophilisiert.

Analog dazu wurde käufliches DMAE (SIGMA) derivatisiert und isoliert.

II.9.2 NMR-Messung

Zur Bestimmung der Verknüpfung der Fmoc-Gruppe mit DMAE und damit der Struktur des Derivats wurde das in II.9.1 gesammelte Produkt bzw. der Standard in deuteriertem Chloroform (CDCl_3) aufgenommen, in ein Glasröhrchen überführt und in einem 400MHz-Kernresonanzspektrometer (BRUKER) vermessen. Dabei wurde sowohl ein eindimensionales ^1H -NMR als auch ein $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Korrelationsspektrum (COSY-Experiment) aufgenommen. Die nötige Mindestmenge an reinem Material betrug ca. 20nmol und ist wiederverwertbar.

II.10 Analyse der Kohlenhydrate

Hierzu wurden jeweils 100µg Scheidenprotein vergleichend in einem Kunststoff-Mikroreaktionsgefäß lyophilisiert. Die Proteinmenge wurde entsprechend dem Gehalt an Aminosucker gewählt, der durch Fmoc-Aminosäureanalytik bestimmt wurde (s. II.4) und gut im Meßbereich lag. Eine der Proben wurde dann, wie in II.8.1 beschrieben, mit Flußsäure behandelt und auf-

bereitet. Anschließend wurden beide Proben in jeweils ein verschraubbares Hydrolyseglasröhrchen überführt, lyophilisiert und mit 500µl 0.25M Schwefelsäure in 85% Essigsäure (MERCK, Darmstadt) in einer Argonatmosphäre 16h bei 80°C erhitzt. Es folgte Zugabe von 550µl einer 0.5M Natronlauge (MERCK, Darmstadt), Trocknen in einer Vakuumzentrifuge (JOUAN, Unterhaching) und zur Entfernung der restlichen Essigsäure eine zweimalige Aufnahme in 500µl Wasser mit anschließender Lyophilisation. Die freigesetzten Monosaccharide wurden durch Zugabe von 500µl 300mM Natriumborhydrid-Lösung gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur reduziert. Nach Zugabe von 150µl 1M Essigsäure wurde lyophilisiert. Die entstandene Borsäure wurde dreimal mit jeweils 2ml Methanol (PROMOCHEM, Wesel), das 1% Essigsäure enthielt, aufgenommen und im Stickstoffstrom als Methylester abgedampft. Die Acetylierung erfolgte dann durch Zugabe von 400µl Acetanhydrid und 400µl Pyridin und Erhitzen auf 100°C für 1h. Die Alditolacetate wurden in 4ml Dichlormethan aufgenommen (PROMOCHEM) und die Lösung viermal mit 1ml Wasser gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase im Stickstoffstrom getrocknet und bis zur weiteren Analyse in 50µl Dichlormethan bei -20°C aufbewahrt. Die gewonnenen Alditolacetate wurden gaschromatographisch separiert und identifiziert. Die Trennungen erfolgten unter Verwendung von Quarzkapillaren mit chemisch gebundenen Phasen (DB1: 60m, DB 210: 30m; ICT, Frankfurt). Als Trägergas wurde Wasserstoff im Gaschromatographen mit einem Druck von 1bar bzw. Helium (GC/MS) mit einem Druck von 2bar eingesetzt. Die Proben wurden nach dem Prinzip der beweglichen Nadel, ein Aufgabesystem für schwer flüchtige Substanzen, auf die Säule gebracht. Temperaturgradient: von 130-200°C steigend bei 1,2°C/min, dann 5°C/min steigend bis 250°C. Die Ionisierung erfolgte unter einem NH₃-Quellendruck von 0.13mbar. Die Pseudomolekülonen wurden durch Single Ion Monitoring erfaßt.

II.10.1 Reduktive Beta-Eliminierung von *O*-Glykanen [45,106-108]

Ca. 1mg suspendiertes Scheidenmaterial wurde in einem Kunststoff-Mikroreaktionsgefäß durch Zentrifugation bei 10.000 x g sedimentiert, zur Entfernung von Salzen mit 1ml Wasser gewaschen und nach erneutem Sedimentieren lyophilisiert. Anschließend wurden 500µl 1M Natriumborhydrid-Lösung (in 0.05M Natronlauge) und 500µl 0.2M Natronlauge zugegeben. Nach 24h Inkubation bei 37°C erfolgte Zugabe von 200µl frischer Natriumborhydrid-Lösung,

gefolgt von weiteren 24h Inkubation. Die Lösung wurde mit wenigen Mikrolitern konzentrierter Essigsäure auf pH 6 eingestellt und die entstehende Borsäure wie in II.10 entfernt. Der Rückstand wurde in 200µl Wasser aufgenommen und durch Gelfiltration auf einer Bio-Gel P2-Säule (400 mesh, BioRad; 1x25cm) im Ammoniumacetatpuffer, 100mM, pH 6, fraktioniert. Untersuchungen an kleineren Aliquoten von *L. sigmodontis* hatten gezeigt, daß die negativ geladenen, substituierten Glykane - gegenüber reinem Wasser als Eluenten – bei Verwendung eines schwachen Puffers im Gel eine geringere Diffusion, und somit geringere Elutionsvolumina, aufwiesen. Zur Bestimmung der kohlenhydrat-haltigen Fraktionen wurden Aliquote, wie in II.4 beschrieben, analysiert und entsprechende Fraktionen vereinigt. Diese wurden dann über eine kleine reverse-phase Vorsäule (20x2 mm I.D., C18 Phase, LiChrospher 100, MERCK) vorgetrennt (Gerät: s. II.3 Narrowbore HPLC). Die Elution und Fraktionierung erfolgten durch 100mM Ammoniumacetat, pH 6.0, (Eluent A) und steigendem Acetonitrilgehalt (Eluent B: wie A mit 80% Acetonitril; v/v); Gradient: 0% B auf 100% B in 50min, 200µl/min Flußrate. Die kohlenhydrat-haltigen Fraktionen, die während der ersten 25 Minuten eluierten, wurden zu einer Stammfraktion im Schliffgläschen vereinigt, lyophilisiert und für die anschließenden Methylierungsanalysen bereit gehalten. Der Gehalt an GalNAc betrug mindestens 50µg.

II.10.2 Freisetzung der O-Glykane mit Hydrazin

Für jede der nachfolgenden, nicht reduzierenden Freisetzungen der O-Glykane wurden jeweils ca. 500µg Scheidenmaterial eingesetzt, entsprechend ca. 50µg GalNAc.

II.10.2.1 Methode nach Kobata [109,110]

Lyophilisiertes Scheidenmaterial wurde im Kunststoff-Mikroreaktionsgefäß mit 500µl wasserfreiem Hydrazin versetzt und nach Überschichtung mit Argon für 14 Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde das Hydrazin (SIGMA) in der Vakuumzentrifuge abgedampft und dreimal mit je 500µl Toluol (Uvasol, MERCK) azeotrop vertrieben.

II.10.2.2 Methode nach Patel [111]

Lyophilisiertes Scheidenmaterial wurde in einem 5ml Glasröhrchen mit Schraubverschluß (MAGV) mit 1ml wasserfreiem Hydrazin versetzt, mit Argon überschichtet, gut verschlossen und 4h im Inkubationsofen bei 95°C behandelt. Unter diesen Bedingungen wurden sowohl O- als auch N-Glykane als Hydrazone freigesetzt.

II.10.2.3 Methode nach Cooper [112]

Im Unterschied zu den beiden obigen Methoden wurde lyophilisiertes Scheidenmaterial mit 200µl 50% (v/v) wäßrigem Hydrazin in 0.4M Triethylamin (SIGMA) oder wahlweise 0.2M Natronlauge (MERCK) solubilisiert und 18h bei 45°C inkubiert. Anschließend wurde in einer Rotationsvakuumpumpe abgedampft und mit Toluol azeotrop abgedampft. Der mit Natronlauge behandelte Ansatz wurde mit 200µl 0.1M Salzsäure neutralisiert und in einer Bio-Gel P2-Gelfiltrationssäule fraktioniert (s. II.10.1); Fraktionen zu je 1ml wurden während der ersten 30 Minuten Elution gesammelt, in einem Schliffgläschen vereinigt und lyophilisiert.

Zur Entfernung der Hydrazongruppe wurden die nach II.10.2.1-II.10.2.3 entstandenen Hydrazone jeweils nach der Lyophilisation in einem Schliffgläschen mit 40µl gesättigter NaHCO₃-Lösung, die 2µl Acetanhydrid enthielt, versetzt und unter Eiskühlung 20min stehengelassen. Nach Aufnahme in 160µl Wasser wurde wie in II.10.1 gelfiltriert und gesammelt. Die *N*-acetylierten Glykane wurden dann mit 500µl 50% (v/v) wäßrigem Aceton im Kunststoffreaktionsgefäß versetzt, gut verschlossen und bei 50°C über Nacht inkubiert. Bei diesem Verfahren wurde das chemische Gleichgewicht vom acetylierten Osazon zum flüchtigen Aceton-Hydrazon verschoben. Nach Lyophilisation konnten die reduzierenden Glykane wie in II.10.4.1 und II.10.4.2 derivatisiert werden.

II.10.3 Methylierung von Glykanen [113-119]

Die freigesetzten und aufgearbeiteten Oligosaccharide wurden in 300µl gläserne Mikroreaktionsgefäße (ZINSSER, Frankfurt) pipettiert, lyophilisiert und über Nacht bei 37°C im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet (Sicapent, MERCK, Darmstadt). Nach Fluten mit getrocknetem Argon wurden in die Gefäße 50µl wasserfreies DMSO (Merck) gegeben und die Proben 90min im Ultraschallbad gelöst. Anschließend erfolgte Zugabe von 50µl 2M Butyllithium in DMSO und Abkühlen auf -20°C. Die Permethylierung wurde durchgeführt durch Zugabe von 50µl frisch destilliertem Iodmethan und 90min Inkubation im Ultraschallbad bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben mit 150µl Wasser versetzt und auf Chromabond C18ec-Säulen (15x100mm) gegeben, welche zuvor mit 5ml Wasser, 5ml Acetonitril, 5ml Methanol und wieder schließlich mit 10ml Wasser equilibriert worden waren. Die Säulen wurden mit 5ml Wasser gewaschen, dann nacheinander mit jeweils

5ml 10% (v/v) wäßrigem Acetonitril, 100% (v/v) Acetonitril und Chloroform eluiert. Die acetonitril- und chloroform-haltigen Fraktionen enthielten die methylierten Glykane, wurden vereinigt und im Stickstoffstrom getrocknet.

II.10.4 Derivatisierung freigesetzter Oligosaccharide

II.10.4.1 Derivatisierung mit 1-Phenyl-3-methyl-pyrazolin-5-on (PMP) [120]

Die nach II.10.2.1-II.10.2.3 freigesetzten Oligosaccharide wurden in einem Kunststoff-Reaktionsgefäß mit 30µl einer 0.5M methanolischen PMP-Lösung (ALDRICH) suspendiert und anschließend mit 30µl 0.3M NaOH-Lösung gemischt. Analog wurden mit dem käuflich erwerbbaaren Disaccharid Gal-GalNAc (SIGMA) und den Monosacchariden GalNAc, GlcNAc, Gal und Glc (jeweils SIGMA) als Referenzverbindungen verfahren. Das Kunststoff-Reaktionsgefäß wurde gut verschlossen und 2h bei 70°C inkubiert. Danach wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 0.3M HCl-Lösung neutralisiert und anschließend 5min bei 10.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200µl Wasser vermischt. Nach Zugabe von 300µl Ethylacetat und einigen Sekunden intensiven Mischens (Vortex) wurde die obere organische Phase abpipettiert und verworfen. Dieser Vorgang wurde noch weitere zwei Male wiederholt, um den größten Anteil an überschüssigem PMP-Reagenz zu entfernen. Die wäßrige Phase wurde dann lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Alternativ konnte die Probe auch direkt nach Extraktion auf eine reverse phase-HPLC-Säule injiziert werden. Eluent A bestand aus 0.1M Ammoniumacetat, pH 5.5 (10% Acetonitril, v/v); Eluent B bestand aus Eluent A mit 25% Acetonitril (v/v). Die Trennung der Oligosaccharide erfolgte auf einer 2.1x250mm Nucleosil C18, 5µm reverse phase-HPLC-Säule (BISCHOFF). Gradient: von 10% auf 100% B in 55 min bei 200µl/min; Geräte s. II.3 Narrowbore HPLC. Detektion erfolgte bei 245nm Extinktion. Um eine optimale Trennleistung der Säule zu gewährleisten, wurde vor jedem analytischen wie präparativen Lauf ein Gemisch der PMP-markierten Referenzsubstanzen aufgetrennt.

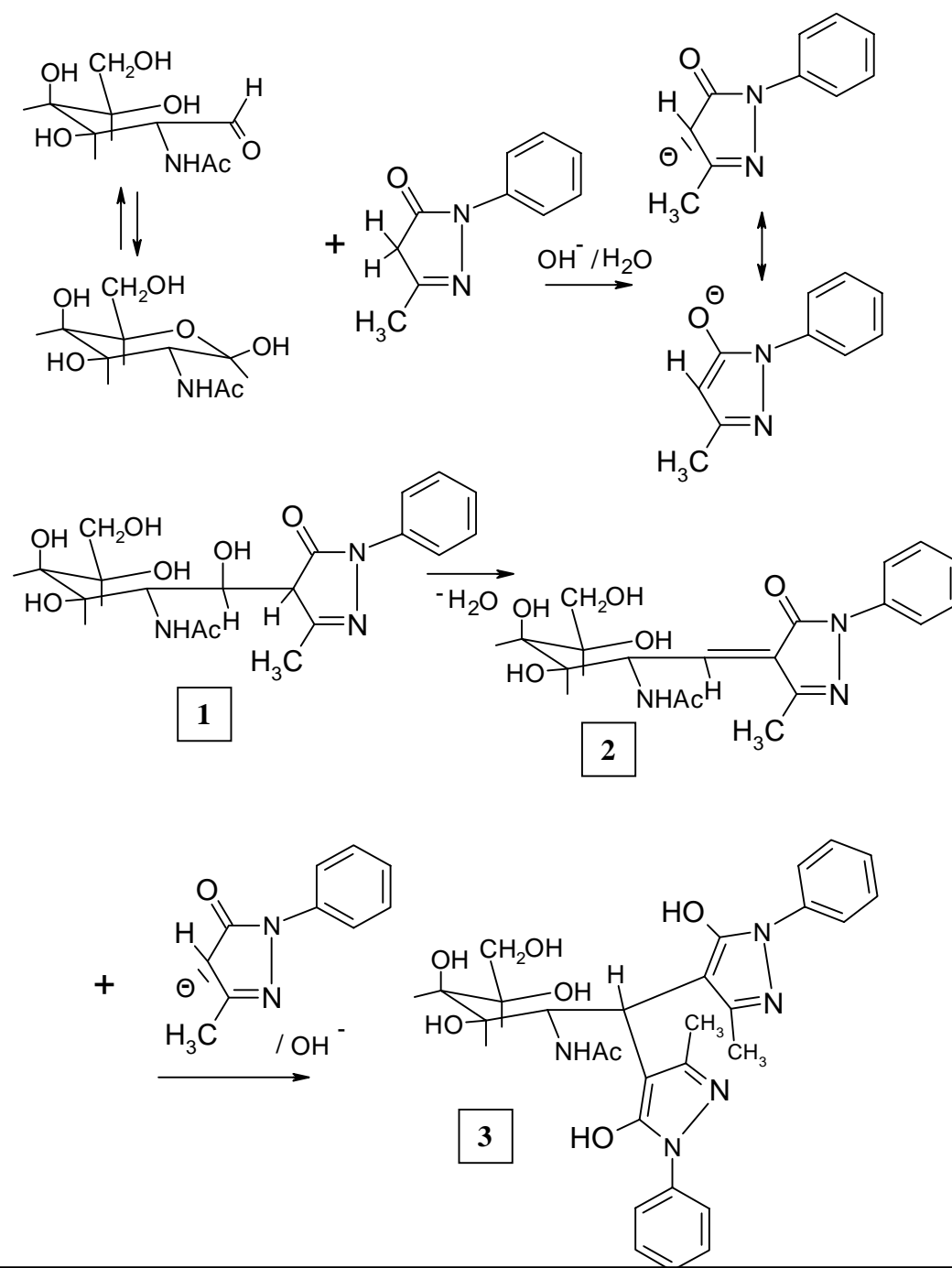


Abb. 8 : Schematische Darstellung der Derivatisierung von Kohlenhydraten mit PMP. Der basenkatalysierte Prozeß beinhaltet zunächst eine Aldoladdition, bei der ein erstes PMP-Molekül in Form des Enolat-Ions die Aldehydform des Glykans nukleophil angreift (1, Aldol). Anschließend erfolgt Wassereliminierung unter Bildung einer α,β -ungesättigten Verbindung (2), welche erneut vom Enolat-Ion eines zweiten PMP-Moleküls in β -Position nukleophil angegriffen wird (3, Michael-Produkt). Die Pyrazolengruppen des Produkts stabilisieren sich durch Bildung eines konjugierten Doppelbindungssystems.

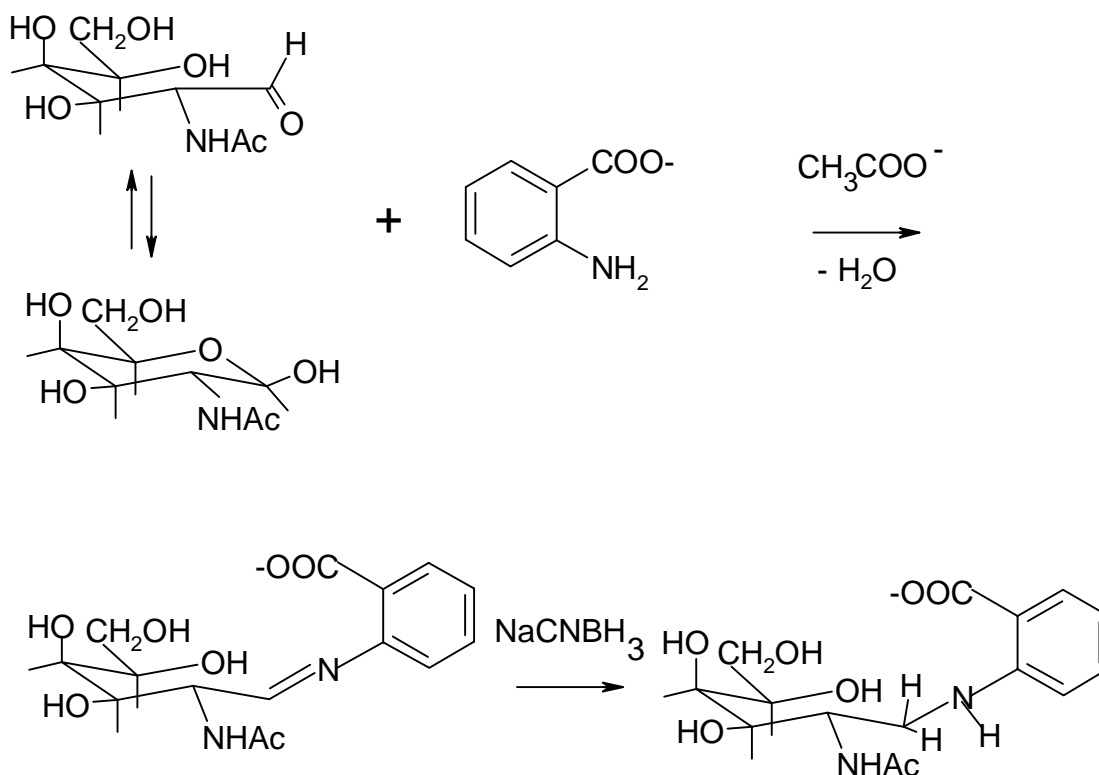


Abb. 9 : Schematische Darstellung der Derivatisierung von Kohlenhydraten mit Anthranilsäure durch reduktive Aminierung.

II.10.4.2 Bausteinanalyse mit Anthranilsäure-Derivatisierung [121]

Zwei Doppelansätze aus jeweils 100 μg *L. sigmodontis*- Scheidenprotein wurden vergleichend mit bzw. ohne vorherige HF-Behandlung mit 4M Trifluoressigsäure versetzt, 4h bei 100°C hydrolysiert und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Derivatisierung wurde der Rückstand in 10 μl 0.6% Na-Acetat-Lösung (w/v) aufgenommen, mit 50 μl 43mM Anthranilsäure in 0.3M NaCNBH₃-Lösung versetzt (gelöst in methanolischer 2.4% Na-Acetat-/ 2% Borsäure-Lösung) und 45min bei 80°C erhitzt. Die Probe wurde dann auf 120 μl mit Elutionspuffer A der nachfolgenden HPLC-Trennung verdünnt. Die Trennung der Monosaccharide erfolgte über eine 4x250mm HPLC-Säule, 4 μm , Superspher100 RP18ec (MERCK, Darmstadt). Eluent A bestand aus 0.2% n-Butylamin, 0.5% Orthophosphorsäure und

1% Tetrahydrofuran (jeweils v/v). Eluent B bestand aus Eluent A mit 50% Acetonitril. Gradient: von 5% auf 18% B in 25min, auf 100% in 1min, 5min 100% isokratisch. Die Detektion erfolgte bei 360nm bzw. 425nm.

II.11 Chemische Synthesen

II.11.1 Direkte Kopplung von Phosphorsäure-*N,N*-dimethylaminoethylester

Das Prinzip der direkten Kopplung von Phosphorsäure-*N,N*-dimethylaminoethylester (Phospho-DMAE) beruht auf der Veresterung des aktiven, trifunktionellen Phosphorsäurehalogenids Phosphoroxychlorid mit der OH-Gruppe von DMAE. Das Produkt (Dichlorphosphorsäure-*N,N*-dimethylaminoethylester) kann direkt ohne aufwendige Aufreinigung ein zweites Mal verestert werden mit freien OH-Gruppen von Serin bzw. Threonin des gewünschten Polypeptids (s. Weg A in Abb.10). Eine zweite Möglichkeit besteht in der Kopplung des Phosphorsäureesters mit der OH-Gruppe von p-Aminophenol. Die freie aromatische Aminogruppe läßt sich leicht in das Isothiocyanat überführen und an andere freie Aminogruppen addieren (s. Weg B in Abb.10). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der direkten Methode besteht darin, daß sich bei der Kopplung in wäßriger Lösung arbeiten läßt, was die Löslichkeit von Polypeptiden und deren Produktausbeuten gegenüber wasserfreien Lösemitteln erhöhen sollte.

II.11.1.1 Kopplung mit Rinderinsulin, -serumalbumin und Ovalbumin

Ca. 3ml Phosphoroxychlorid (POCl_3 , ca. 30mmol), in 20ml Chloroform gelöst, wurden in einem 50ml Rundkolben bei Raumtemperatur mit ca. 1ml DMAE (10mmol) vorsichtig tropfenweise versetzt unter kräftigem Rühren. Das Produkt fiel als weißes Hydrochlorid aus und wurde portionsweise in Glaszentrifugenröhrchen mit Schliff pipettiert und abzentrifugiert (1min bei 3000U/min, Tischzentrifuge, HETTICH). Die schwerere, klare Chloroformphase, die noch Phosphoroxychlorid enthielt, ließ sich als untere Phase mit einer Pasteurpipette abpipettieren. Zur Entfernung des restlichen POCl_3 wurden in zweimaliger Wiederholung die Zentrifugengläschen vollständig mit frischem Chloroform aufgefüllt, mit einem Glasstopfen verschlossen und geschüttelt. Nach anschließendem Zentrifugieren wurde das Chloroform

erneut entfernt. Nach Abblasen des restlichen Chloroforms im Stickstoffstrom wurde der weiße Rückstand in 2ml Acetonitril, der 20% (v/v) TFA enthielt, gelöst. Mit 25ml der gleichen Lösung wurden in jeweils getrennten Ansätzen ca. 35mg Rinderinsulin (ca. $3.8\mu\text{mol}$, entsprechend $11.3\mu\text{mol}$ OH-Gruppen), 0.5g Rinderserumalbumin (BSA, $70\mu\text{mol}$ bzw. 4.2mmol OH-Gruppen) und 0.1g Ovalbumin ($3\mu\text{mol}$ bzw. $30\mu\text{mol}$ OH-Gruppen) in 50ml Rundkolben unter Rühren in Lösung gebracht. Danach wurden die 2ml gelösten Hydrochlorids langsam hinzuge tropft und nach vorsichtiger Zugabe von ca. 3-5ml Triethylamin wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Vermeidung eines Niederschlags des Kopplungsprodukts wurde nach Beendigung der Reaktion ein Überschuß von ca. 10ml Triethylamin dazugegeben, um die restliche Trifluoressigsäure zu neutralisieren, und danach langsam mit 10ml Wasser versetzt. Die klare Lösung wurde in ein 100ml Becherglas gegeben. Von dieser Lösung wurden 20ml-Aliquote direkt über reverse-phase-HPLC gereinigt, nach vorherigem Ansäuern mit $200\mu\text{l}$ TFA. Die Chromatographiebedingungen für Insulin waren: Geräte s. II.3 Narrowbore HPLC; $2.1\times 250\text{mm}$ Säule, Nucleosil 100, C18 Phase, BISCHOFF); Eluent A: 0.1% TFA in Wasser, Eluent B: 0.08% TFA in Acetonitril, Gradient: 0% B auf 100% B in 45min, $200\mu\text{l}/\text{min}$ Flußrate. Detektion: UV/Fluoreszenz.

Für BSA und Ovalbumin: Geräte s. II.3 Normal-HPLC; $4\times 120\text{mm}$ Säule, C4 Phase, LiChrospher 300 endcapped, MERCK), Gradient: wie bei Insulin, $1\text{ml}/\text{min}$ Flußrate. Detektion: UV/Fluoreszenz.

Die Produktausbeuten bzw. der Gehalt an gebundenem DMAE wurden per Aminosäureanalytik bestimmt bzw. mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert. Außerdem erfolgte eine Kontrolle mit Hilfe der SDS-PAGE.

II.11.2 Kopplung von Phospho-DMAE über p-Aminophenol [122]

Analog zu II.11.1.1 hergestelltes Dichlor-Phospho-DMAE (ca. 10mmol) wurden in 10ml Acetonitril gelöst und in einen 50ml Rundkolben gegeben. Es folgte portionsweise Zugabe von 3mmol p-Aminophenol (MERCK), gelöst in 10ml Acetonitril, und unter Rühren 5ml Triethylamin, zum Neutralisieren der während der Reaktion entstehenden Salzsäure. Es wurde über Nacht gerührt, Acetonitril im Stickstoffstrom abgeblasen und mit 40ml Wasser hydrolysiert.

Anschließend folgte Entfernen des Wassers in der Rotationsvakuumpumpe bis zur Trockene. Das so entstandene Produkt, Dimethylaminoethyl-p-Aminophenyl-Phosphorsäurediester (DAP, Abb.10) wurde in 5ml 0.1M NaHCO₃-Lösung aufgenommen und in einem 50ml Rundkolben mit 5ml einer 3mM Lösung aus Thiophosgen in Chloroform versetzt. Nach festem Verschließen mit einem Glasstopfen wurde mit einem Magnetrührer für 1h so stark gerührt, daß beide Phasen intensiv in Berührung kamen. Bei diesem Prozeß wurde die aromatische Aminogruppe des p-Aminophenols in Isothiocyanat umgewandelt. Nach Beendigung der Reaktion wurde zur Trennung der beiden Phasen einige Minuten stehen gelassen und die schwerere Chloroformphase abpipettiert. Durch jeweils dreimalige Zugabe von 5ml frischen Chloroforms und Abblasen wurde überschüssiges Thiophosgen entfernt. Nach Zugabe von in 10ml wäßriger, hydrogencarbonat-gepufferter Lösung von BSA bzw. Ovalbumin wurde über Nacht unter leichtem Rühren die Kopplung durchgeführt. Die Reaktion erfolgte dabei an freien Aminogruppen der Polypeptide (an Lysin und / oder dem N-Terminus). Die Aufreinigung und Charakterisierung der Produkte erfolgte wie unter II.11.1.1 beschrieben (s. Bedingungen bei BSA).

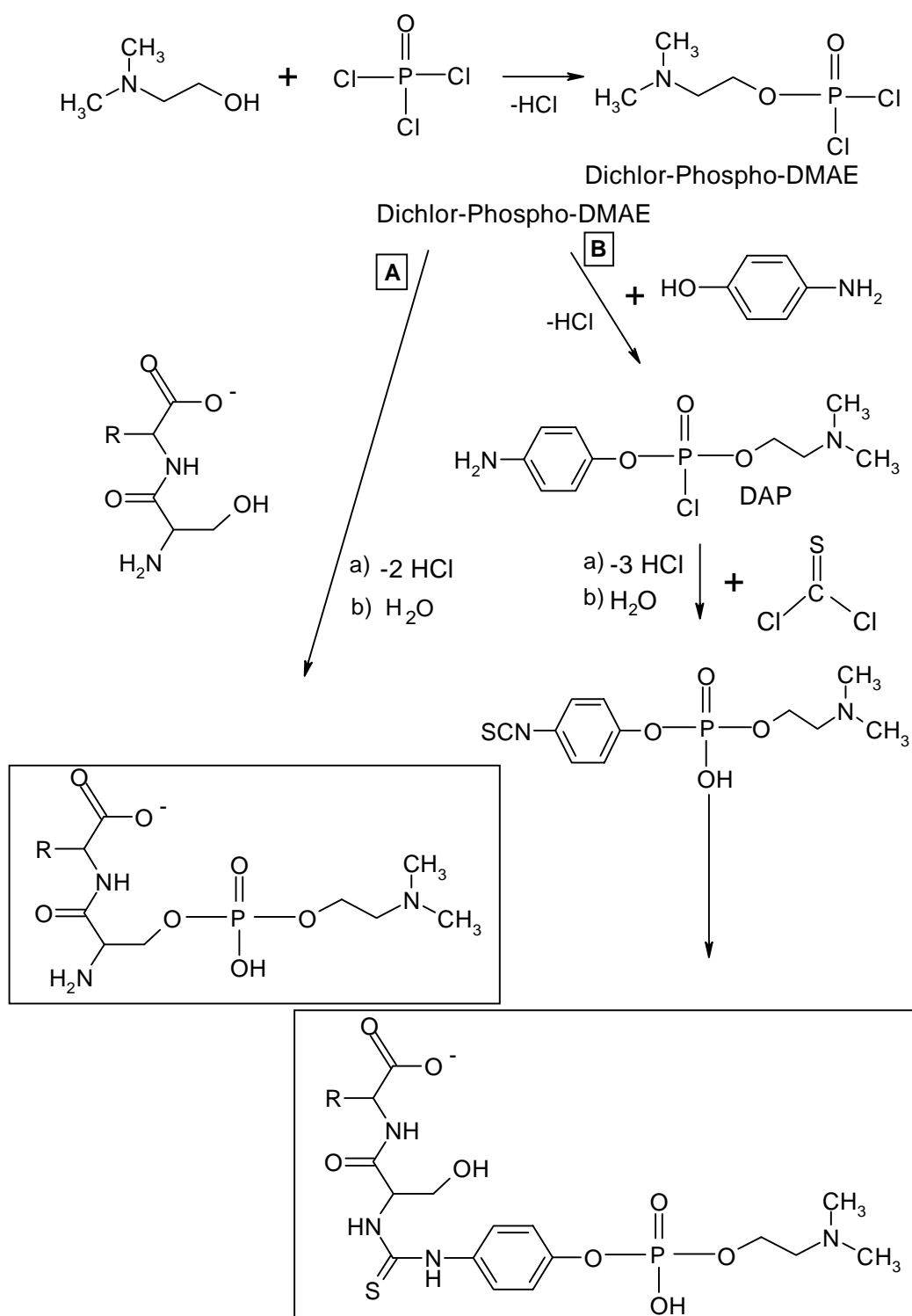


Abb. 10: Schematische Darstellung der direkten Kopplung von Phospho-DMAE (A) sowie über das Isothiocyanat des p-Aminophenols (B) an eine Polypeptidkette

III. Ergebnisse

III.1 SDS-PAGE von *L. sigmodontis*-Scheiden/Stains-All-Färbung

Wie eine SDS-PAGE der Scheiden von *L. sigmodontis* ergab, zeigen insbesondere die Oberflächenproteine shp3 und shp3a mit dem kationischen Farbstoff Stains-All eine intensive Blaufärbung, was auf das Vorkommen stark negativer Ladungen zurückzuführen ist. Auf gleicher Höhe in dem silber-gefärbten Gel ist nur shp3 negativ gefärbt. Auf der Höhe der anderen Proteine sind relativ schwache, wenig signifikante, blaue Banden zu erkennen (s. Abb. 11). Wie Versuche mit phosphorylierten bzw. Sulfat- und Uronsäure tragenden Standardsubstanzen (Phosvitin aus Eigelb bzw. Chondroitinsulfat aus Haiknorpel) gezeigt hatten, weisen phosphorylierte Proteine eine wesentlich sensitivere Blaufärbung im Gel auf als sulfatierte und/oder mit Uronsäuren substituierte Polypeptide. Demnach könnte das Ergebnis auf das Vorhandensein von Phosphatresten in shp3 und 3a hinweisen.

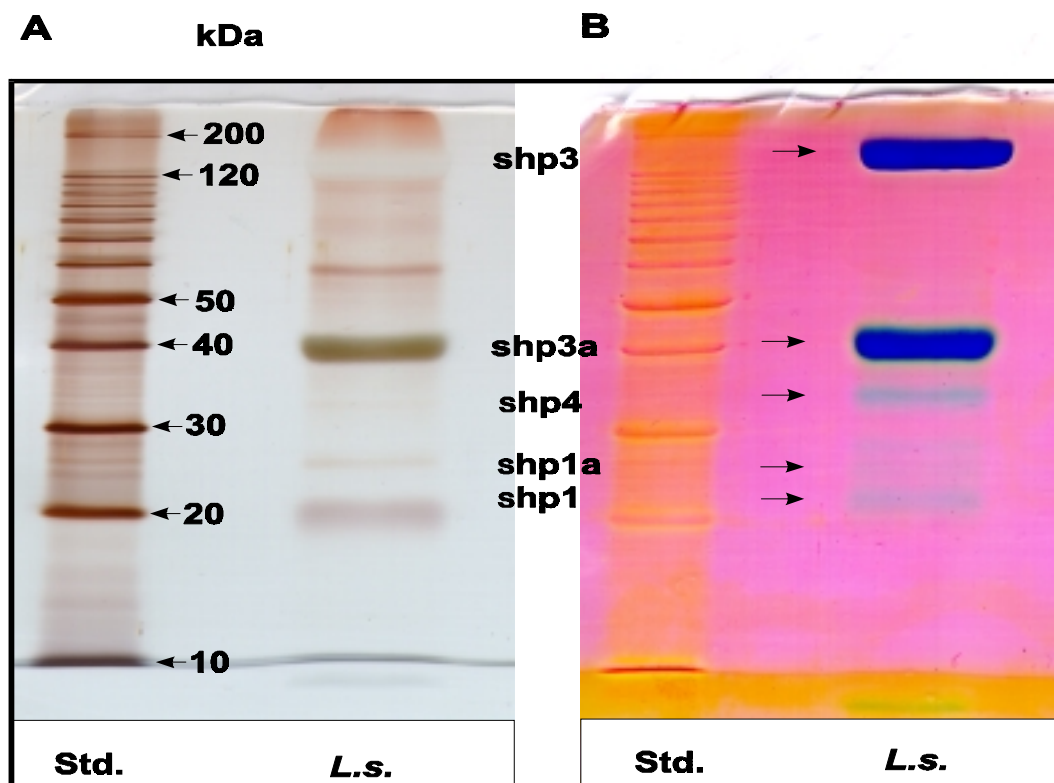
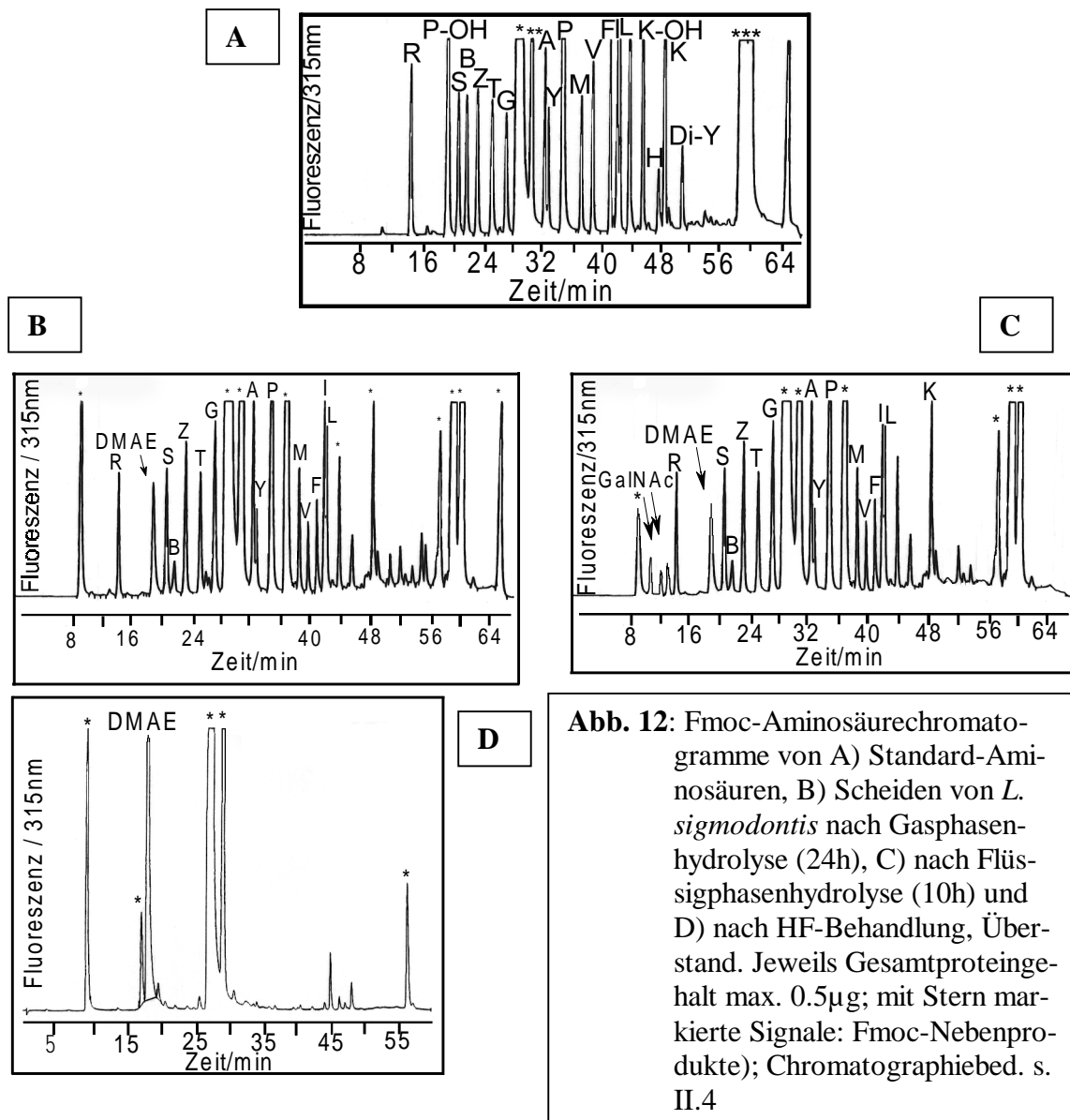


Abb. 11: SDS-PAGE der Scheiden von *Litomosoides sigmodontis* (*L.s.*). A) gefärbt mit Silber, B) gefärbt mit Stains-All, einem kationischen Farbstoff. Jeweils in der linken Spur ist ein Proteinleiterstandard aufgetragen (Std.)

III.2 Fmoc-Aminosäureanalyse

Ein Vergleich beider HCl-Hydrolysen von *L. sigmodontis*-Scheidenmaterial zeigte, daß bei der Flüssigphasenhydrolyse neben Aminosäuren auch Aminosucker als Fmoc-Derivate detektierbar waren. Die Hydrolysekinetik ergab weiterhin, daß bereits nach ca. 10h Hydrolyse mit flüssiger 6M HCl eine quantitative Freisetzung aller Aminosäuren erfolgte. Im Vergleich dazu waren 24h Hydrolyse in der Gasphase nötig (vgl. Abb.12 B,C). Bei der Hydrolyse mit HF war bemerkenswert, daß ausschließlich DMAE detektiert wurde, neben wenigen Verunreinigungen (s. Abb.12D). Massenspektrometrische Daten belegen, daß Polypeptide durch 48% HF überwiegend schonend dephosphoryliert werden (s. Abb.25).



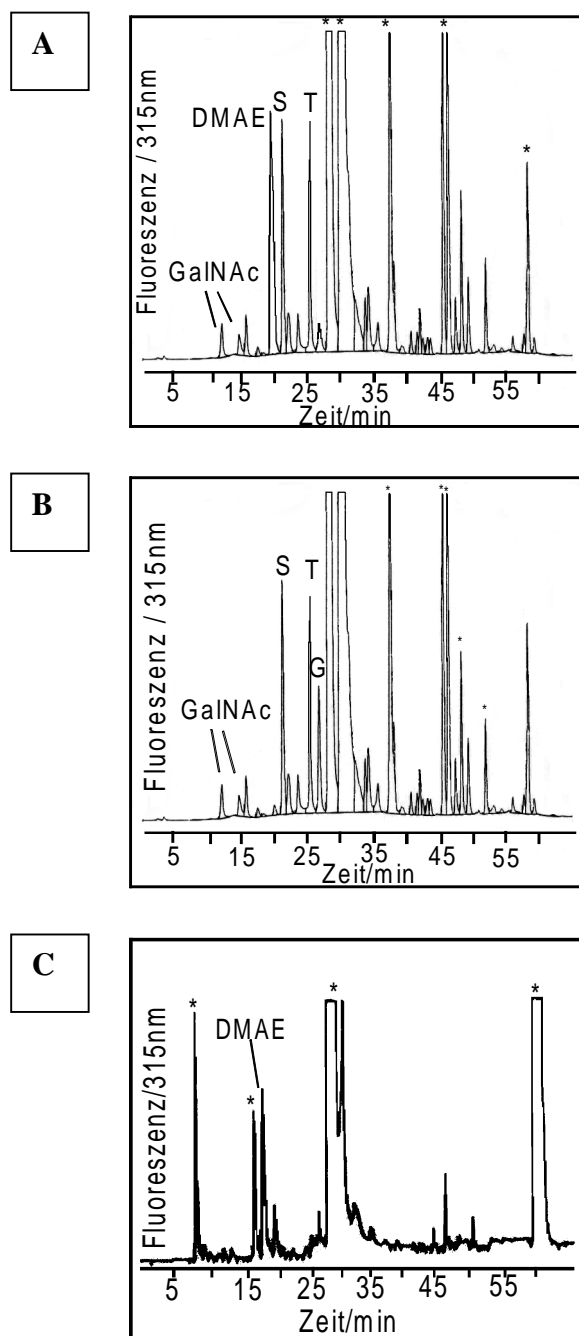


Abb. 13: Fmoc-Analysen von shp3a A) vor HF-Behandlung, ca. 25pmol, B) nach HF-Behandlung und Mikrodialyse (max. 30pmol) und C) vom Dialysat nach HF-Behandlung (max. 30pmol; mit Stern markierte Signale: Fmoc-Nebenprodukte) Chromatographiebedingungen s. II.4

Wie die Aminosäurezusammensetzung von shp3a zeigt, sind neben einem großen Anteil DMAE Serin und Threonin die dominierenden Bestandteile (Abb.13A). Demgegenüber weist die Primärstruktur nur minimale Mengen anderer Aminosäuren auf. Auch der Aminosucker GalNAc ist gut detektierbar. Nach Dephosphorylierung mit HF und anschließender Entfernung von DMAE durch Mikrodialyse bleibt das Verhältnis Serin:Threonin weitgehend erhalten und ebenso der GalNAc-Anteil (s. Abb.13B). Die Untersuchung des Dialysats ergab DMAE als einzige Komponente, neben Verunreinigungen (s. Abb.13C). Wie die spätere massenspektrometrische Analyse des Retentats (s. Abb.25) ergab, sollten mit der HF-Behandlung quantitativ alle über Phosphodiester gebundenen Substituenten, einschließlich DMAE, auf shp3a entfernt worden sein. Ein entsprechender Nachweis für den durch HF-Behandlung erfolgten Verlust negativer Ladung, und damit Stains-All negativ färbender Proteinbanden im Polyacrylamidgel, gelang nicht. Das durch HF verursachte veränderte Laufverhalten der Scheidenproteine führte zum Verschmieren der Banden, was einen Vergleich mit den nicht dephosphorylierten Proteinen unmöglich machte. Jedoch fiel die Stains-All-Färbung negativ aus und vorhandenes Protein konnte durch Silberfärbung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

III.3 Glycerol- und Cholin-Analysen

Die Cholin-Analyse der Scheiden von *L. sigmodontis* ergab für 100µg Scheidenprotein einen Anteil von ca. 0.4%, wobei die entsprechenden Reagenzienkontrollen keine Cholin-kontaminationen aufwiesen. Die Glycerol-Analysen ergaben keine signifikante Anwesenheit von Glycerol. Die Kontrollwerte dagegen wiesen relativ höhere Werte auf, welche auf „Kontaminationen“ aus dem Percoll zurückzuführen waren, das bei der Gewinnung von Scheidenmaterial verwendet wurde.

Die Spuren von Cholin sowie das Nichtvorhandensein von Glycerol widerlegen eindeutig die ursprüngliche Vorstellung von vorhandener Teichonsäure. Nachgewiesenes Cholin könnte jedoch Bestandteil von Phospholipiden in der Mikrofilarienscheide sein oder ein Metabolit, der sich von DMAE ableitet.

III.4 Isolierung und Strukturbestimmung des Bausteins DMAE als Fmoc-Derivat

Wie frühere Beobachtungen bei Einsatz unterschiedlicher Mengen an hydrolysiertem Schei-

denmaterial ergaben, läßt sich fast ausschließlich Fmoc-DMAE aus einem Hydrolysat gewinnen, wenn das Scheidenmaterial gegenüber dem Fmoc-Reagenz in hohem Überschuß vorliegt. Mit Hilfe präparativer HPLC konnten 0.1µmol an Fmoc-DMAE und 1mmol Standard in reiner Form gewonnen werden (s. Abb. 14).

Wie die ^1H -NMRSpektren eindeutig zeigen, sind Standard und Probe identisch, weisen also die gleichen chemischen Verschiebungen (shifts) auf (vgl. Abb.15A,B und Tab.3).Darüber hinaus ließen sich anhand eines ^1H , ^1H -Kopplungsspektrums (COSY) bei dem Standard die einzelnen Strukturbestandteile des Moleküls nachweisen. Für eine entsprechende Anwendung

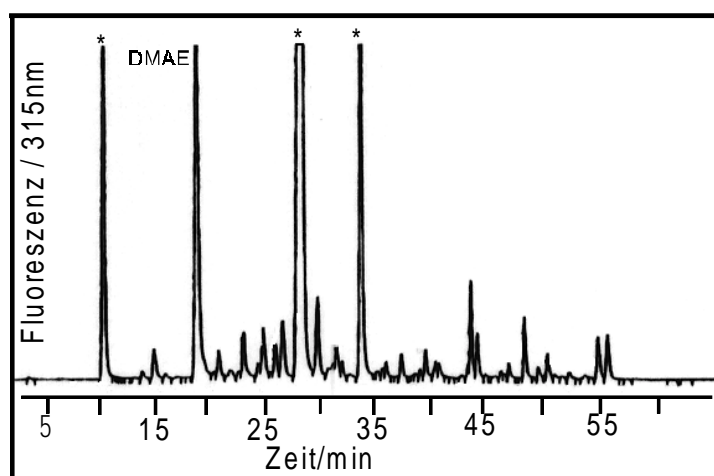
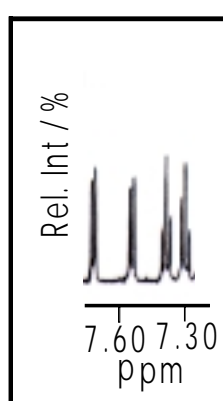
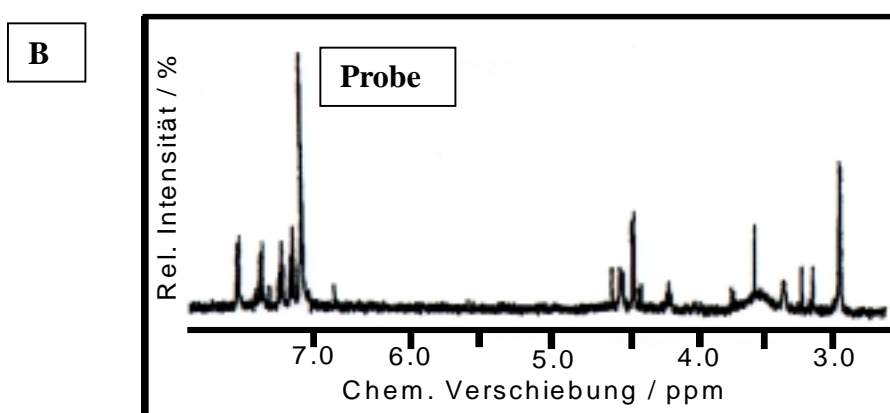
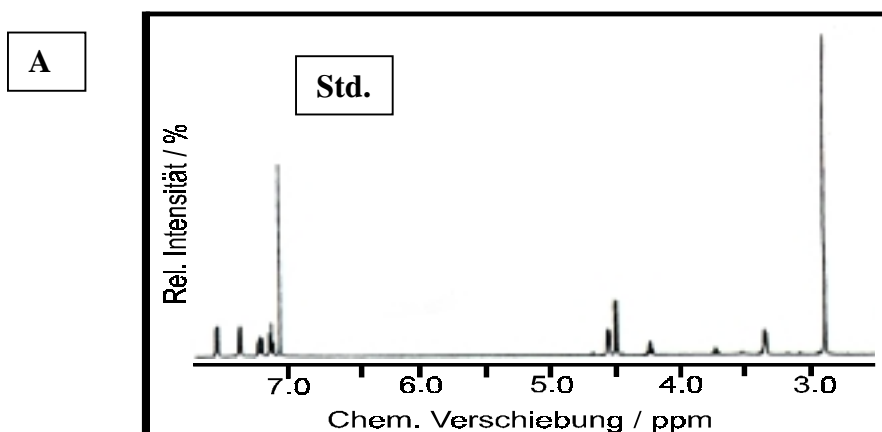


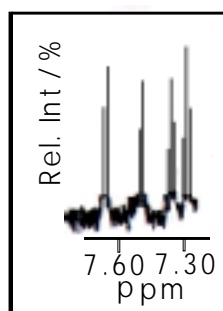
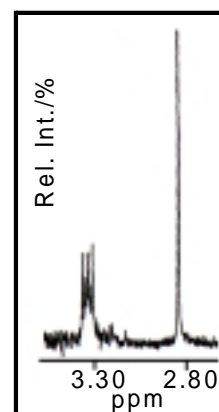
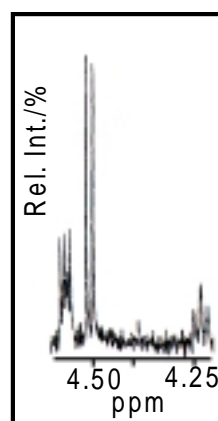
Abb.14: Präparative Isolierung von Fmoc-DMAE aus ca. 100µg Scheidenhydrolysat. Deutlich ist das umgekehrte Derivatisierungsverhältnis gegenüber einem analytischen Lauf (max. 0.5µg) zu sehen. (vgl. Abb.12B,C; mit Stern markierte Signale: Nebenprodukte); Chromatographiebedingungen siehe II.4

dieses Experiments auf die zu untersuchende Probe war die isolierte Menge nicht ausreichend. Aus dem ^1H -Spektrum geht eindeutig hervor, daß das Fmoc-Molekül offenbar mit der OH-Gruppe des DMAE verknüpft ist, da im Spektrum einerseits kein breites Signal einer freien OH-Gruppe zu beobachten ist und andererseits die beiden Methylgruppen des DMAE hochfeldverschoben sind (s. Abb. 15B). Bei einer Derivatisierung des Stickstoffatoms (Quarternisierung) würde der umgekehrte Fall vorliegen.

Wie dem COSY-Experiment zu entnehmen ist, entsprechen die Signale, die auf der Diagonalen liegen, den Protonengruppen, die zum eigentlichen Molekül Fmoc-DMAE gehören. Und nur die zur Diagonalen sich spiegelbildlich verhaltenden Signale stellen die



Std.



Probe

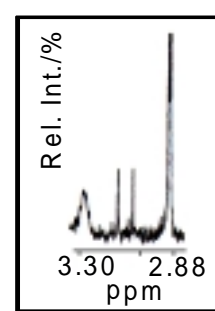
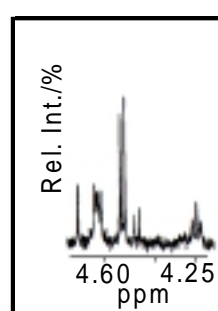


Abb. 15: Die ^1H -NMR-Spektren von Fmoc-DMAE als Standard (A) im Vergleich mit dem aus *Litomosoides sigmodontis*-Scheiden isolierten Fmoc-DMAE (B). Im unteren Feld noch einmal ein Detailvergleich der einzelnen Signalgruppen.

strukturell dazu gehörenden benachbarten Protonengruppen dar. So ist zu ersehen, daß im Hochfeld (aliphatische Protonen) zwei Methylengruppen ($-\text{CH}_2-$) direkt miteinander verknüpft sind (s. Abb. 18A). Anhand von Inkrementberechnungen bekannter NMR-Standards läßt sich zeigen, daß beide Methylengruppen im magnetischen Umfeld von Heteroatomen wie N bzw. O liegen (nicht gezeigt).

Signal δ /ppm	Gruppe	Multiplizität	^3J -Kopplung
4.24	a	t	$\text{CH}-\text{CH}_2$
4.50	b	d	CH_2-CH
4.60	c	m	CH_2-CH_2
3.33	d	m	CH_2-CH_2
2.90	e+f	s	--
7.32	$\text{H}_1-\text{H}_2-\text{H}_3$ $\text{H}_2-\text{H}_3-\text{H}_4$	dd	- CH=CH -
7.41	$\text{H}'_1-\text{H}'_2-\text{H}'_3$ $\text{H}'_2-\text{H}'_3-\text{H}'_4$	dd	- CH=CH -
7.57	H_1-H_2 H_4-H_3	d	- CH=CH -
7.75	$\text{H}'_1-\text{H}'_2$ $\text{H}'_4-\text{H}'_3$	d	- CH=CH -

Tab.3: Übersicht der chemischen Verschiebungen (δ) aller im ^1H -NMR-Spektrum gemessenen Kopplungen von Fmoc-DMAE

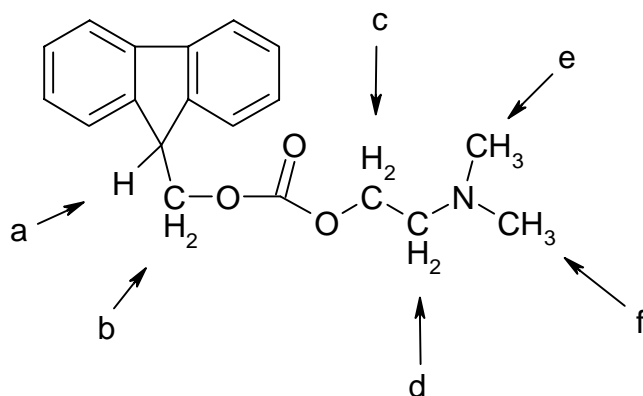


Abb.16: Struktur von Fmoc-DMAE mit Angabe der in Tab.3 aufgeführten Signalgruppen im Hochfeld

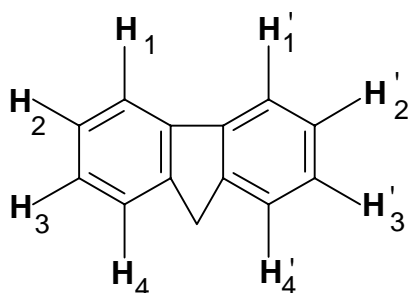
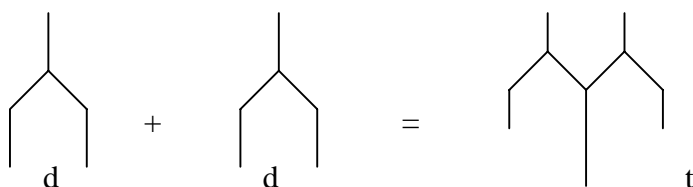


Abb.17: Das Fluoren-Ringsystem des Fmoc-Moleküls, zur Veranschaulichung der zu „Pseudotriplets“ koppeln- den, benachbarten, aromatischen Protonen (s. Tab.3 und Erläuterung im Text)

Die aromatischen Protonen des Fluorens im Tieffeld des Spektrums zeigen ein bei der 400MHz Feldfrequenz des Gerätes typisches Aufspaltungsmuster in Form von „Pseudo-Triplets“, die tatsächlich aber Dubletts von Dubletts sind, also benachbarte aromatische Protonen des Fluorens, deren Dublettsignale partiell zusammenfallen:



Die beiden Methylengruppensignale im Hochfeld ergäben bei einer ausschließlichen Nahkopplung (nur über max. drei Bindungen, 3J) Triplets mit dem Integral 2, da zwei Protonen. Die Multiplizität eines Signals ergibt sich aus der Gleichung:

$$M = n + 1 \quad ; \quad M = \text{Multiplizität, } n = \text{Zahl der Nachbaratome}$$

Durch die empfindlich hohe Feldfrequenz des Gerätes ist jedoch das zweite Triplet bei $\delta 3.33/4.60$ in ein Multiplett aufgespalten, da für jedes einzelne Signal des Triplets zusätzlich die Kopplung mit anderen, weiter entfernt liegenden Protonen sichtbar wird.

Deutlich zu sehen ist das Dublett bzw. Triplet bei $\delta 4.25/4.50$ (Abb.15B bzw. A), welches die Kopplung des tertiären Fluorenylprotons mit den Methylenoxyprotonen zeigt, mit den Integralverhältnissen 1 bzw. 2.

Das starke Singulett mit dem Integral 6 (d.h. 6 Protonen) ganz rechts im Hochfeld zeigt schließlich die beiden chemisch identischen und bei Raumtemperatur nicht unterscheidbaren Methylgruppen des DMAE.

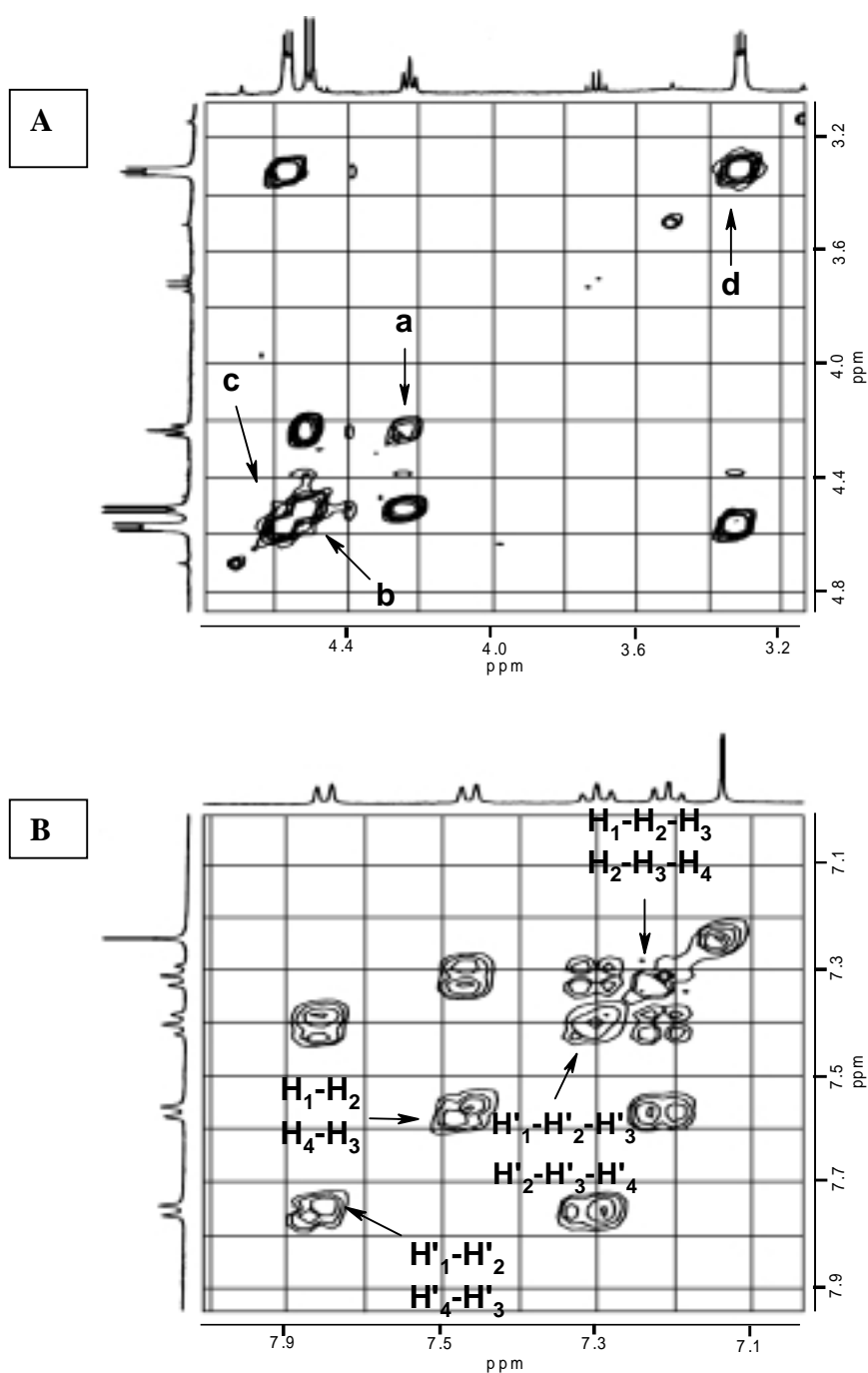


Abb. 18: ^1H , ^1H -Korrelationsspektrum von Fmoc-DMAE. A) Aliphatische Protonen, B) aromatische Protonen. Die strukturell zusammengehörigen Signalgruppen befinden sich jeweils spiegelsymmetrisch zur Diagonalen (von links unten nach rechts oben verlaufend). Die Signale auf der Diagonalen sind identisch mit denen des korrelierenden Spektrums. Signale a-d bzw. $\text{H}_1\text{-H}_4$ entsprechen den in Abb. 16 bzw. Abb. 17 markierten Protonen.

III.5 Kohlenhydrate

III.5.1 Gaschromatographie

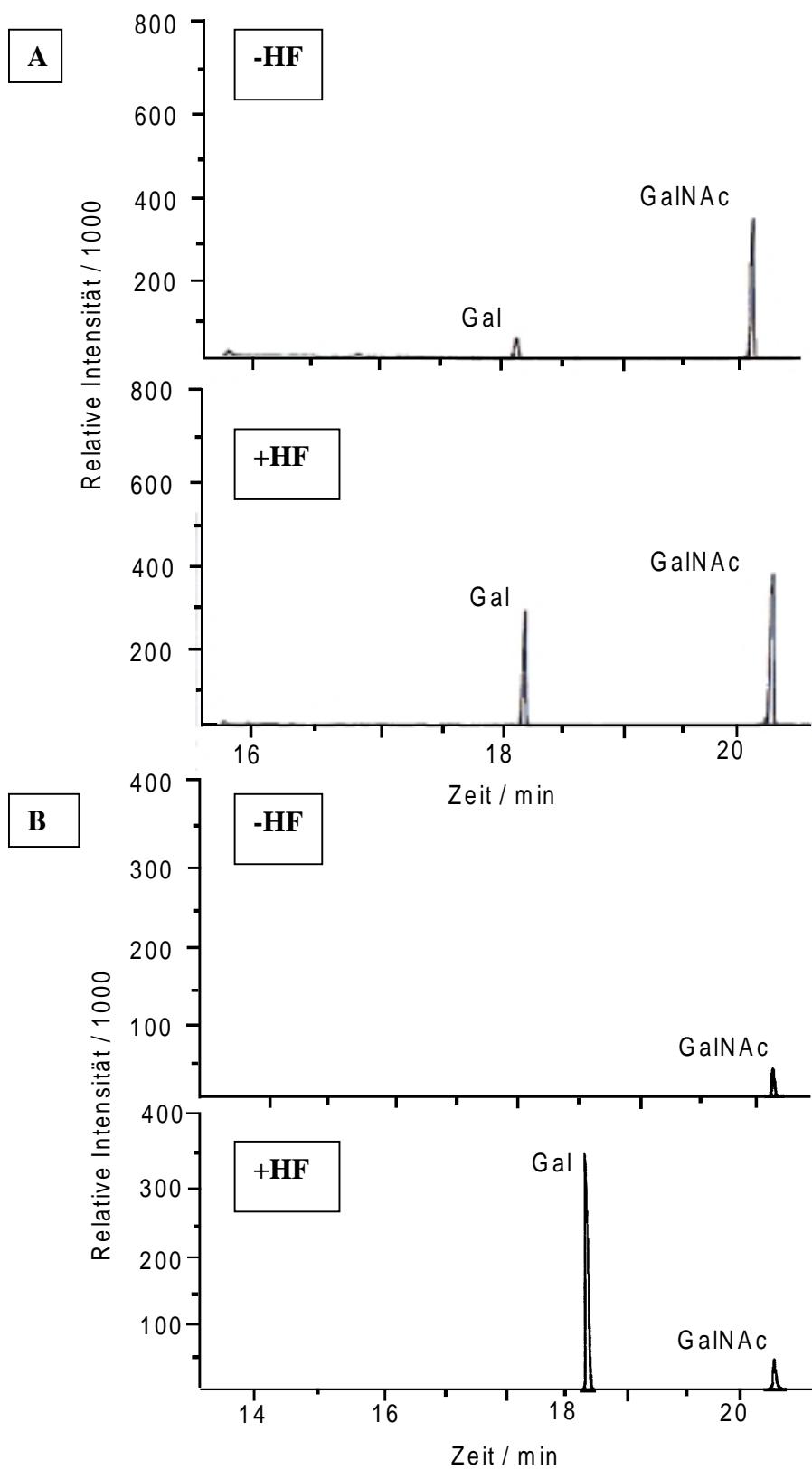


Abb. 19: Gaschromatographische Analyse der Monosaccharid-Komponenten von *L. sigmodontis*-Scheiden (A) und isoliertem shp3a (B), jeweils vor und nach HF-Behandlung. Chromatographiebedingungen siehe II.10.1

Die Bausteinanalyse von *L. sigmodontis*-Scheidenmaterial hatte nach der in II.8 beschriebenen Hydrolysemethode lediglich das Vorhandensein von GalNAc ergeben. Erst nach vorheriger Dephosphorylierung mit HF war zusätzlich Galaktose nachweisbar, verbunden mit einem weiteren Anstieg von GalNAc. Der insgesamt größte Anteil der Kohlenhydrate ist demnach phosphoryliert und somit nach der standardisierten Hydrolyse gaschromatographisch nicht erfaßbar. In Analogie zu den Analysen ganzer Scheiden läßt sich auch bei shp3a erst nach vorheriger Dephosphorylierung neben GalNAc auch Galaktose nachweisen. Da shp3a sowie shp3 als einzige Polypeptide in den Scheiden von *L. sigmodontis* DMAE-Reste über Phosphodiesterbrücken tragen, ist das Analyseergebnis ganzer Scheiden auf den Anteil von shp3a und 3 zurückzuführen. Aus den durch reduktive Beta-Eliminierung freigesetzten, methylierten und partiell acetylierten Kohlenhydraten der Scheiden wurden gaschromatographisch vor und nach HF-Behandlung sowohl modifiziertes als auch unmodifiziertes GalNAc identifiziert. Das gleiche Ergebnis zeigte Galaktose. Zudem wurde eine interne Galaktose identifiziert, was auf das Vorhandensein eines größeren Saccharids schließen ließ (s. Abb.20 und III.6).

Ein Vergleich der beiden Freisetzungsmethoden für *O*-Glykane aus *L. sigmodontis*-Scheidenproteinen mit anschließender Methylierung bzw. PMP-Derivatisierung ergab sowohl für die Hydrazinolyse als auch die reduktive Beta-Eliminierung eine vergleichbar sensitive Detektion.

Vielfache Quantifizierungen des Galaktose- und GalNAc-Anteils ganzer Scheiden mittels Gaschromatographie und Fmoc-Aminosäureanalyse haben ein reproduzierbares Verhältnis GalNAc:Gal von 2:1 ergeben. In jeweils 100µg-Aliquoten Scheiden wurden experimentell ca. 6µg *N*-Acetylgalaktosamin und ca. 3µg Galaktose detektiert (Uronsäuren s. III.5.3). Demgegenüber wurde gaschromatographisch in shp3a ein Verhältnis von ca. 1:5 gefunden, was jedoch angesichts der stark mengenabhängigen Detektion von GalNAc als nicht verläßlich angesehen werden konnte. Auf Grund mangelnden Materials konnten mit shp3a keine analogen Fmoc-Aminosäureanalysen durchgeführt werden.

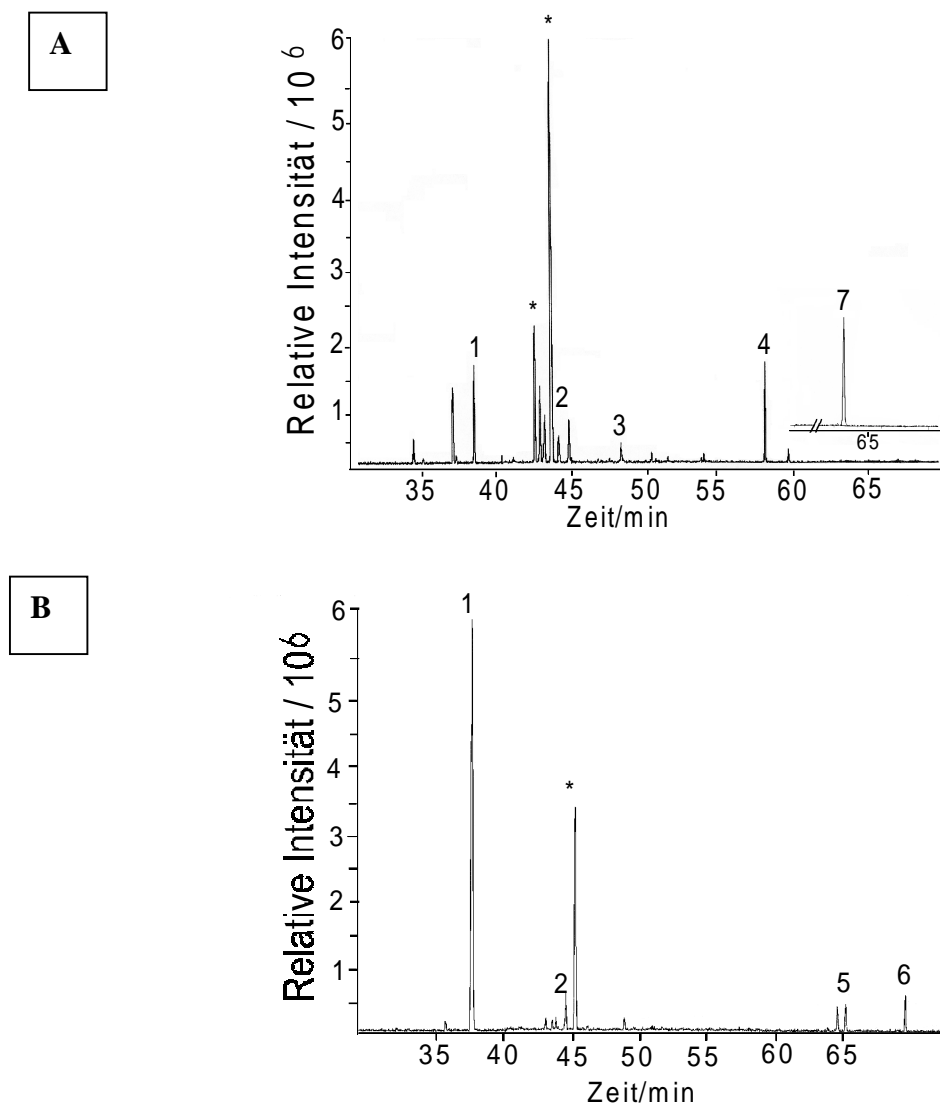


Abb. 20: GC/MS-Analyse methylierter, partiell acetylierter Monosaccharide (Signale 1-6; s. auch Tab. 4) aus ca. 1mg *L. sigmodontis*-Scheidenmaterial zur Untersuchung ihrer Verknüpfung untereinander. A) Methylierung vor HF-Behandlung, B) nach HF-Behandlung. Signal 7 im kleinen überlagerten Spektrum von A) stellt eine separate Messung dar. Mit Stern markierte Signale: Verunreinigungen. Chromatographische Bedingungen siehe II.10.1, II.10.3 und II.8.1

III.5.2 PMP-Derivatisierung

Das Ergebnis der Auftrennung PMP-markierter Kohlenhydrate aus *L. sigmodontis* mit reverse-phase Chromatographie ließ sich mehrfach reproduzieren. Weiterhin konnten anhand der Elutionszeiten der eingesetzten, mit PMP derivatisierten Standards die Signale 1 und 2 in

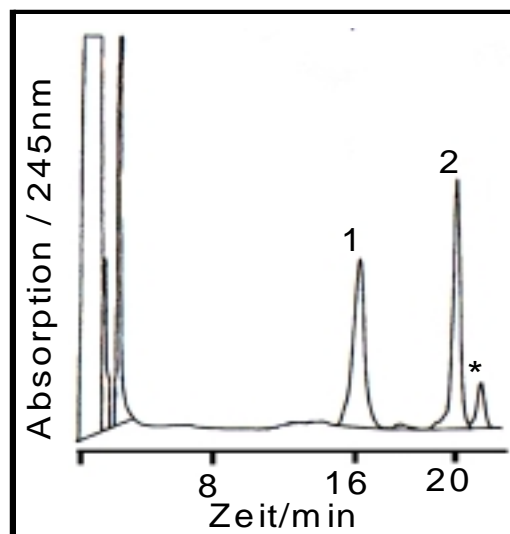


Abb.21: Reverse-Phase-Chromatogramm hydrazinolytisch freigesetzter, PMP-markierter Kohlenhydrate aus *L. sigmodontis*-Scheiden. Signal 1 und 2 komigrieren mit dem PMP-Derivat eines Disaccharids bzw. *N*-Acetylgalaktosamin. Mit Stern markiertes Signal: Nebenprodukt. Chromatographiebedingungen s. II.10.4.1

Abb.21 als PMP-Disaccharid bzw. PMP-Aminozucker vorcharakterisiert werden. Strukturelle Zuordnungen konnten schließlich mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie getroffen werden (s. Abb. 24). PMP-Uronsäuren konnten weder chromatographisch noch massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

III.5.3 Anthranilsäure-Derivatisierung

Das Verhältnis GalNAc:Gal nach Quantifizierung durch die Anthranilsäure-Methode ergab, in Übereinstimmung mit den gaschromatographischen Daten, einen Wert von 2:1. Zudem konnte das Signal einer Uronsäure detektiert und anhand eines Glucuronsäure-Standards zu ca. 0.2% bestimmt werden. Da verschiedene, mit Anthranilsäure derivatisierte Uronsäuren unter den angegebenen chromatographischen Bedingungen komigrieren, war eine Identifizierung des detektierten Signals nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

III.6 Massenspektrometrie

III.6.1 Kohlenhydrate

Anhand der mittels reduktiver Beta-Eliminierung freigesetzten, methylierten Glykane konnte im MALDI-TOF-Massenspektrometer ein Signal detektiert werden, das einem Trisaccharid entsprach, das aus zwei Hexosen und einem *N*-Acetylhexosamin bestand und sieben Phospho-DMAE-Reste trug. Nach vorheriger HF-Behandlung und anschließender Methylierung konnte der Massenverlust von sieben Phospho-DMAE-Inkrementen bestätigt werden. Dieses Ergebnis wurde zweimal reproduziert.

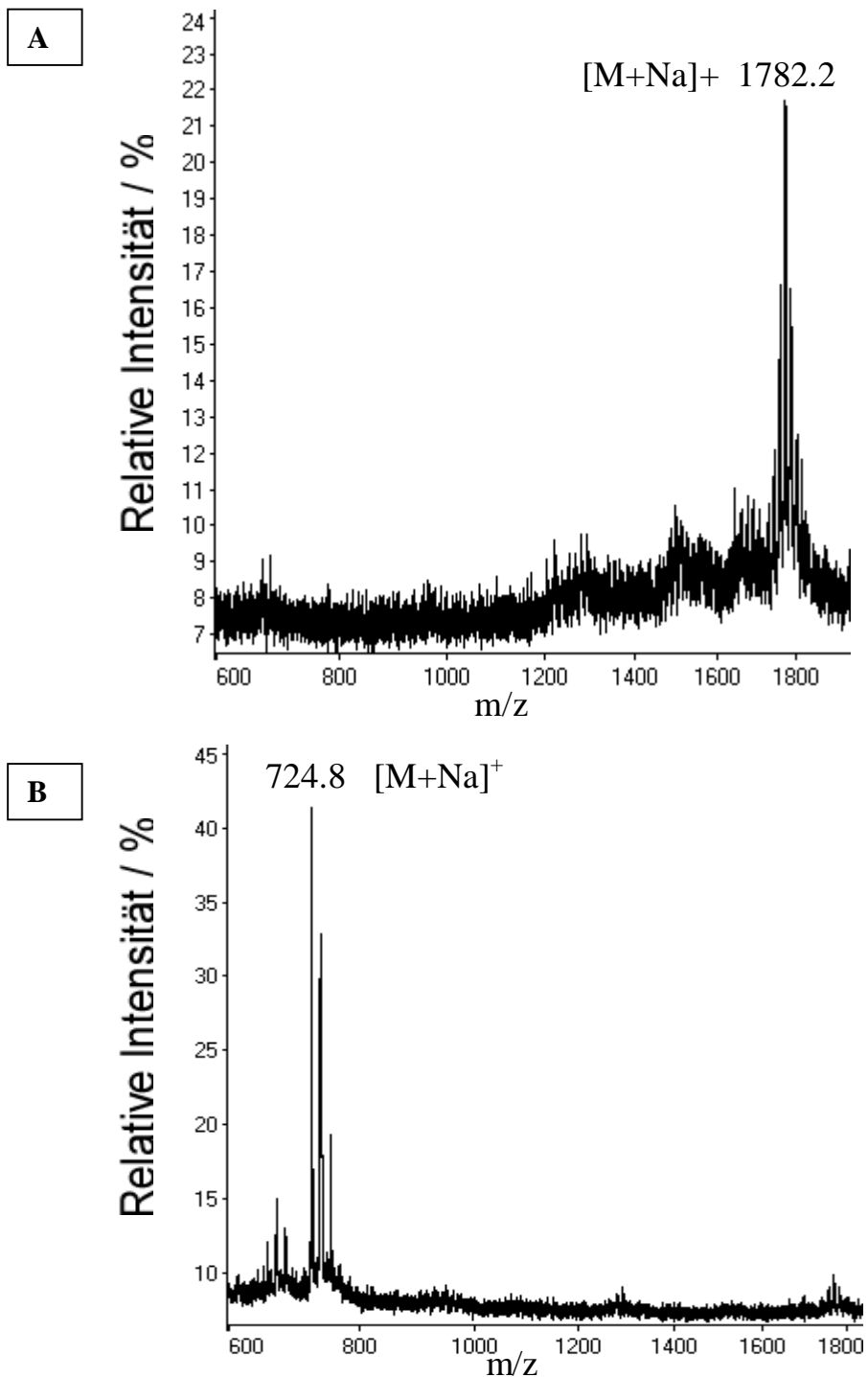


Abb. 22: MALDI-TOF-MS von methylierten Glykanen aus *L. sigmodontis*-Scheiden: A) vor, B) nach HF-Behandlung. Das Signal in A) entspricht einem Trisaccharid (Hex-Hex-HexNAc-OH), welches sieben methylierte Phospho-DMAE-Reste trägt. Die Massendifferenz der Signale in A) und B) entspricht exakt der Masse von sieben Phospho-DMAE-Inkrementen.

Mit Hilfe der PMP-Derivatisierung (s. II.10.4.1) konnte zudem neben freiem, monomeren GalNAc ein Disaccharid isoliert werden, bestehend aus Gal-GalNAc (s. Abb.21, Signale 2 bzw. 1). Beide Substanzen konnten sowohl mit käuflichen Standards kochromatographisch identifiziert als auch per MALDI-TOF-MS bestätigt werden (Abb.24). Eine Isolierung des entsprechend derivatisierten Phospho-DMAE-tragenden Trisaccharids gelang nicht. Generell zeigte sich bei massenspektrometrischen Untersuchungen negativ geladener Standard-Disaccharide, daß die Nachweissensitivität per MALDI-TOF-MS mit steigender Ladung des

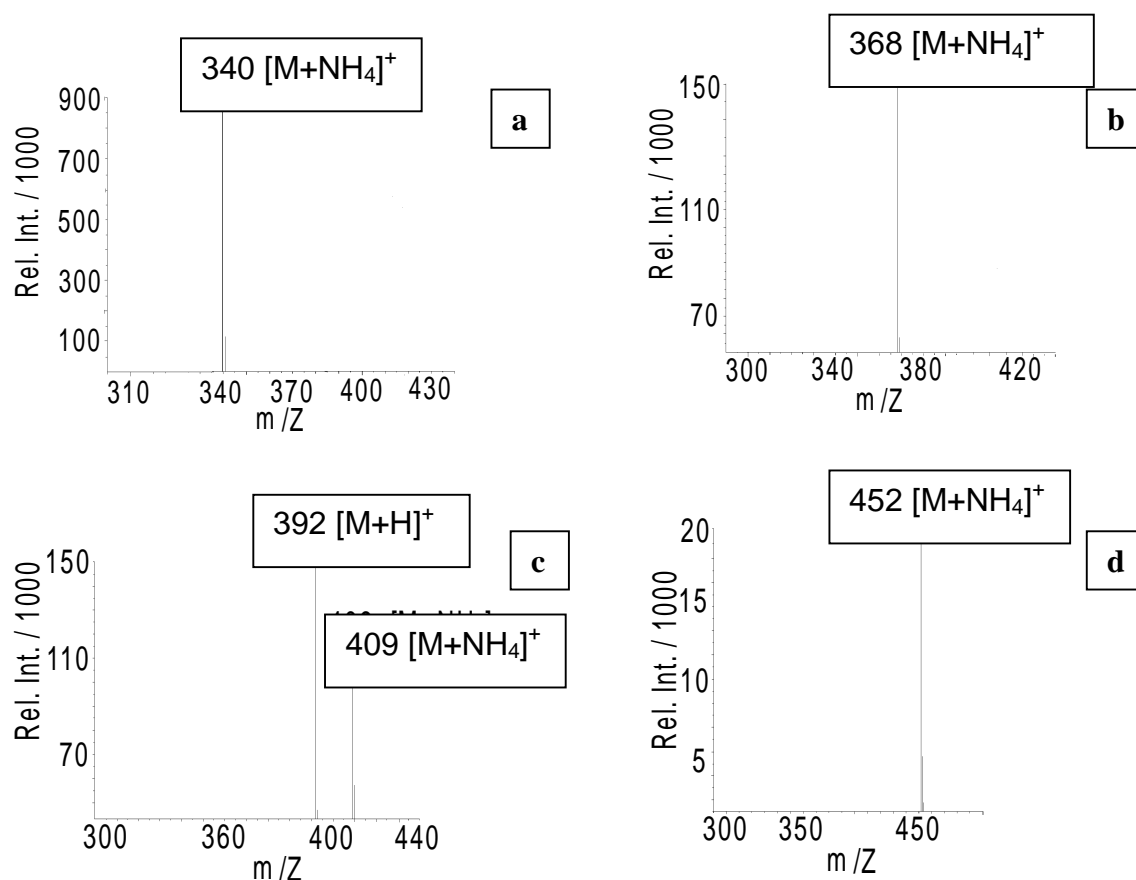


Abb. 23: Single Ion Monitoring-Spektren einiger (partiell methylierter) Alditolacetate nach Aufbereitung von *L. sigmodontis*-Scheiden (s. Abb. 20): a) 2,3,4,6-Gal, b) 2,4,6-Gal, c) 4,6-GalNAc und d) peracetylierte Galaktose (Bezeichnungen s. Legende Tab.4)

Glykans abnahm – sowohl im positiven als auch im negativen Ionen-Modus.

Die Methylierungsanalyse zeigte ausschließlich eine über Position C3 verknüpfte Struktur des Trisaccharids Gal-Gal-GalNAc. Durch vergleichende Analyse zweier Parallelansätze vor und nach HF-Behandlung konnten die Positionen der *O*-Phosphorylierungen zum Teil bestimmt werden. Abb. 22 zeigt das MALDI-TOF-Massenspektrum des isolierten, methylierten Trisac-

charids vor und nach der Dephosphorylierung mit HF (A bzw. B).

Während bei der terminalen Galaktose dieses Trisaccharids alle vier OH-Gruppen modifiziert vorlagen, ließen sich die restlichen drei substituierten Positionen nicht eindeutig der internen Galaktose bzw. dem *N*-Acetylgalaktosamin zuordnen. Die Masse 340 in Abb. 23a (Tab.4 Signal1) zeigt die permethylierte, bzw. die Masse 452 (Abb.23d) die peracetylierte, vierfach substituierte, terminale Galaktose des Trisaccharids; ferner stellt die Masse 340 die terminale Galaktose des unsubstituierten Disaccharids Gal-GalNAc dar. Die Massen 368 und 396 in Tab.4 (Signal 2 u. 3 in Abb.20 A bzw. B) ließen sich als 3-substituierte bzw. 2,3-disubstituierte Galaktose identifizieren und weisen damit auf eine interne Galaktose hin, die zum Teil an Position C2 substituiert ist. Die beiden noch verbleibenden Substitutionen sollten folglich auf dem GalNAc an den Positionen C4 und C6 zu finden sein. Das Signal für ein dementsprechend dreifach acetyliertes GalNAc konnte jedoch nicht detektiert werden. Stattdessen wurde nach HF-Behandlung lediglich ein an Position C3 verknüpftes GalNAc mit der Masse 392/409 identifiziert (vgl. Abb.20 Signal 6, Abb.23c u. Tab.4 Signal 6), welches das Trisaccharid-Modell sowie das bereits identifizierte Disaccharid Gal-GalNAc vervollständigt; des weiteren ein terminales, unsubstituiertes GalNAc mit der Masse 364/381, welches bereits mit der PMP-Derivatisierungsmethode als Monosaccharid bestätigt werden konnte.

-HF / Signal-Nr.*	Masse	Substanz	Strukturelement
1	340	2,3,4,6-Gal	terminale Galaktose
2	368	2,4,6-Gal	3-subst. Galaktose
3	396	4,6-Gal (?)	evtl. 2,3-disubst. Gal.
4	364/381	3,4,6-GalNAc	terminales GalNAc
7	452	peracetyl. Gal	terminale, unsubst. Galaktose

+HF / Signal-Nr.**	Masse	Substanz	Strukturelement
1	340	2,3,4,6-Gal	terminale Galaktose
2	368	2,4,6-Gal	3-subst. Galaktose
5	381	n.b. ^a	HexNAc(?)
6	392/409	4,6-GalNAc	3-subst. GalNAc

* vgl. Abb. 20 A) ** vgl. Abb. 20 B)

^a nicht eindeutig zuordenbar bzw. nicht identifizierbar

Tab. 4: Auflistung der in Abb.20 gaschromatographisch aufgetrennten, partiell methylierten Alditolacetate und ihre massenspektrometrische Identifikation (GC/MS). Obere Tabelle, Methylierung vor HF-Behandlung; untere Tabelle, Methylierung nach HF-Behandlung

Legende zu Tab.4:

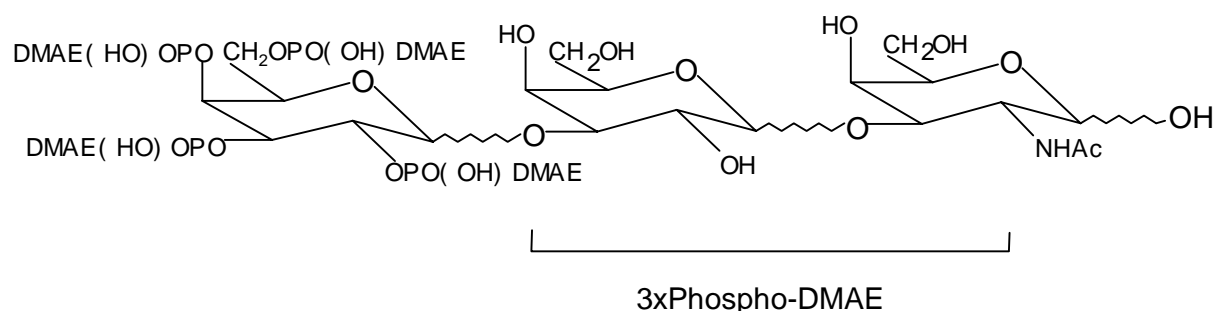
Die in der Substanzspalte aufgeführten Kürzel sind wie folgt zu lesen:

2,3,4,6-Gal : 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-1,5-di-*O*-acetylgalactitol

2,4,6-Gal : 2,4,6-Tri-*O*-methyl-1,3,5-tri-*O*-acetylgalactitol etc.

3,4,6-GalNAc : 3,4,6-Tri-*O*-methyl-1,5-di-*O*-acetyl-2-(*N*-methyl)-acetamidogalactitol

In Kombination der GC/MS-Daten mit denen aus MALDI-TOF-Massenspektrometrie kann folgende Struktur des Trisaccharids postuliert werden:



Bei Vergleich der Kohlenhydratanalysen der Scheiden von *Litomosoides sigmodontis* mit denen verwandter Nematodenspezies, wie *Brugia malayi* und *Toxocara canis*, zeigte sich übereinstimmend keine Sialylierung der *O*-Glykane [45,49](s. Diskussion).

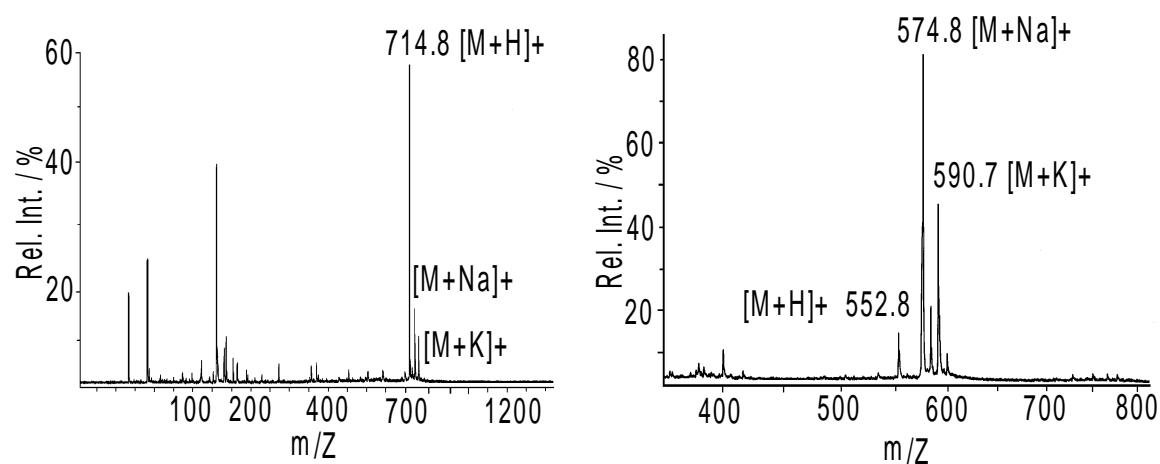


Abb. 24: MALDI-TOF-Massenspektren der beiden isolierten, PMP-markierten Glykane, isoliert aus *L. sigmodontis*-Scheiden. Links: PMP-GalNAc-Gal (s. Abb. 21 Signal 1), rechts: PMP-GalNAc (s. Abb. 21 Signal 2) .

III.6.2 Shp3a

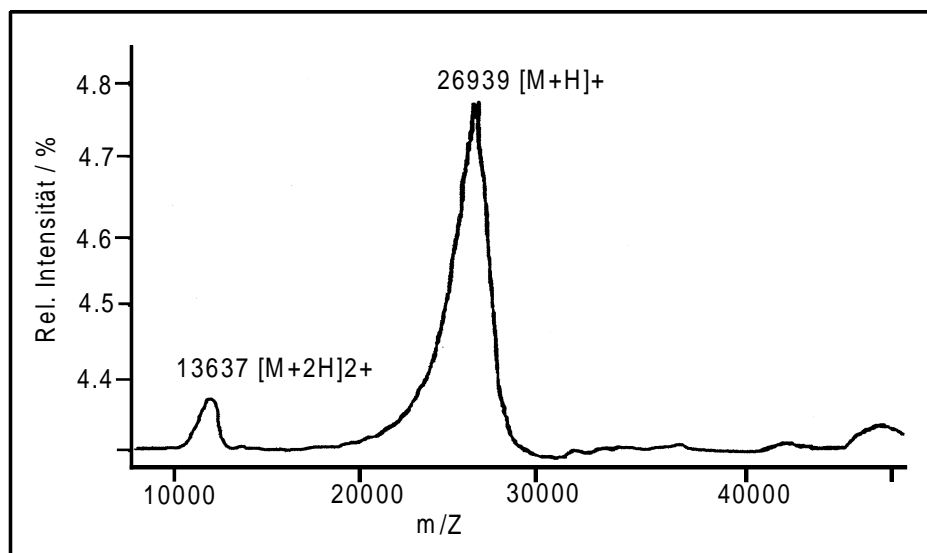


Abb. 25: MALDI-TOF-Massenspektrum von shp3a nach HF-Behandlung und Mikro dialyse (ca. 7nmol; Reflektor-Modus). Der Massenverlust von ca.18 kDa steht in guter Übereinstimmung mit der Gesamtzahl von ca. 110 DMAE-Resten - als Phosphodiester am Protein gebunden (s. Tab.1). Die mittlere Breite des Hauptsignals ist auf Grund der nach Dephosphorylierung verbleibenden Glykosylierungen mit ca. 2kDa beträchtlich.

MALDI-TOF-MS-Analysen von „nativem“, carboxymethylierten shp3a lieferten für dieses Protein eine mittlere Molekülmasse von 45.5kDa (pers. Mitteilung Dr. Hintz). HF-Behandlung führte zu einem Massenverlust von ca. 18kDa (Abb.25), was die Anwesenheit von etwa 110 Phospho-DMAE-Resten indiziert.

Vielfache Aminosäure- bzw. -zuckeranalysen in Verbindung mit gaschromatographischen Quantifizierungen von Galaktose zeigten weiterhin konvergierend, daß der größte Anteil der posttranslationalen Modifikationen von shp3a aus GalNAc, Gal sowie DMAE und Phosphat besteht. Damit wurden über 90% der Gesamtmasse von shp3a belegt (s. Tab.5 u. Diskussion).

	Mol/Mol shp3a	Masse/kDa
cDNA		11.3
DMAE	~110	9.7
Phosphat	n.b. ^a	8.7
GalN(Ac)	~22*	4.5
Gal	~44	7.3
Ser/Thr	54 /45 ^c	
		$\Sigma = 41.5 \text{ kDa}$

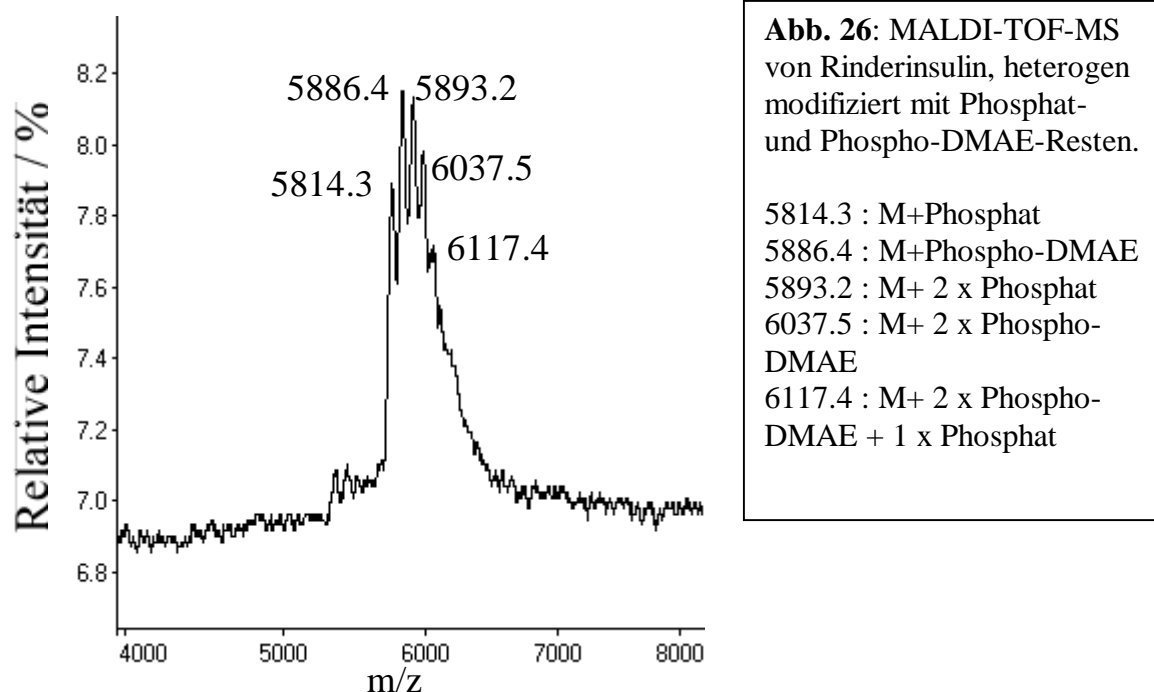
*korrigierter Wert auf Grund von Detektionsverlusten durch Phosphorylierung

^a rechnerisch aus Massenverlust im MS nach HF-Behandlung bestimmt

^c Gesamtzahl der Serine/Threonine, die nicht durch Edman-Sequenzierung erfassbar, aber nicht zwingend modifiziert

Tab. 5: Tabellarische Übersicht aller bzgl. shp3a analytisch zugänglicher Daten und deren Gesamtmasse. Berücksichtigt man bei dem gaschromatographisch bzw. aminosäureanalytisch bestimmten Anteil der Kohlenhydrate und DMAE-Reste einen Fehlerbereich von ca. 10%, so lassen sich über 90% der Bestandteile an Modifikationen belegen.

III.7 Chemische Synthesen



Die direkte Kopplung von Phospho-DMAE-Resten an freie OH-Seitengruppen von Polypeptiden konnte an Rinderinsulin und -serumalbumin (BSA) erfolgreich durchgeführt und demonstriert werden.

Auf Grund seiner geringen Masse (<10kDa) war Rinderinsulin als einziges Polypeptid nach der direkten Kopplung massenspektrometrisch genau charakterisierbar, so daß eine exakte Anzahl veresterter OH-Gruppen gemessen werden konnte. Wie Abb. 26 zeigt, ist das Kopplungsprodukt von Rinderinsulin heterogen mit Phosphat und Phospho-DMAE modifiziert. Aus der Masse 6117.7 Da läßt sich errechnen, daß maximal zwei Phospho-DMAE-Reste zusammen mit einem Phosphat an die Peptidkette gekoppelt werden konnten.

Dies zeigt, daß alle drei im Rinderinsulin vorhandenen OH-Gruppen selektiv verestert wurden. Parallel wurden anhand von Aminosäureanalysen zwei Phospho-DMAE-Reste quantifiziert, was das massenspektrometrische Ergebnis in Abb. 26 bestätigte.

Jedoch erzielten die aminosäureanalytisch durchgeführten Quantifizierungen dieser Synthese bzgl. der eingesetzten Peptidmenge lediglich eine Ausbeute von 0.3%, nach HPLC-Reinigung des Produkts (ca. 100µg).

Die direkte Kopplung von Phospho-DMAE an Rinderserumalbumin erzielte eine Kopplungsausbeute von über 90% (d.h. 55 von 59 vorhandenen OH-Gruppen) bzw. eine Gesamtausbeute des HPLC-gereinigten Produkts von ca. 30% (Daten nicht gezeigt). Auf Grund der zu erwartenden, hohen Heterogenität des Kopplungsprodukts war eine massenspektrometrische Charakterisierung nicht möglich gewesen. Die Stains-All-Färbung jedoch zeigte ein blau gefärbtes, über den gesamten Trennbereich des Gels verschmiertes Produkt (nicht gezeigt).

Die Kopplungsversuche von Phospho-DMAE an BSA und Ovalbumin mit p-Aminophenol über Isothiocyanat waren mit ca. 50% Kopplungsausbeute ebenso erfolgreich verlaufen. Die Produktausbeute war mit jeweils 30% vergleichbar mit dem Ergebnis der direkten Kopplung an BSA. Auch bei diesen Experimenten war auf Grund der großen Heterogenität der Produkte keine Detektion im Massenspektrometer zu beobachten gewesen. Demgegenüber ließen sich beide Kopplungsprodukte in der SDS-PAGE als blau-gefärbte, diffuse Banden darstellen, wie Abb. 27 zeigt. Es ist klar zu erkennen, daß Ovalbumin gegenüber Rinderserumalbumin

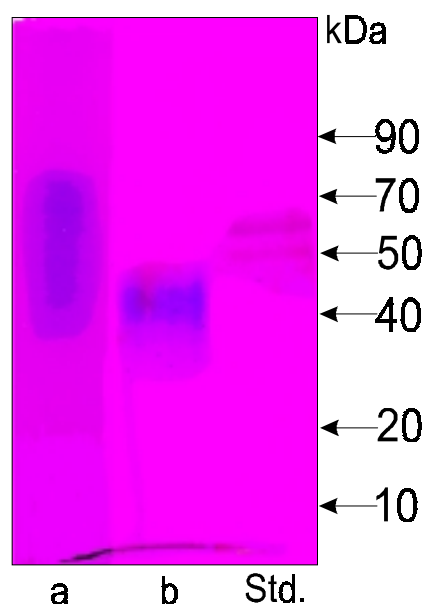


Abb.27: SDS-PAGE und Stains-All-Färbung von Rinderserumalbumin (BSA) (a) und Ovalbumin (b), chemisch gekoppelt mit p-Aminophenyl-Phospho-DMAE über Isothiocyanat.

offenbar eine schärfere Bande aufweist. Der Hauptanteil der heterogenen Kopplungsprodukte von BSA erstreckt sich mit ca. 40-70kDa über einen breiten Massenbereich, während sich die Hauptbande von Ovalbumin vorwiegend bei ca. 41kDa befindet und deutlich oberhalb der Molekülmasse des unmodifizierten Proteins liegt (ca. 38kDa).

Neben der Kopplung über p-Aminophenol als Isothiocyanat wurden verschiedene andere Vernetzungsmethoden und -moleküle experimentell untersucht, wie z.B. die Verwendung von Ethyl-dicyclohexyl-carbodiimid (EDC), die Succinylierung von Lysinen im Protein und ihre Reaktion mit Aminopropyl-Phospho-DMAE oder die reduktive Aminierung von mit Periodat oxidiertem Glycerol-3-Phospho-DMAE. Jedoch waren die Produktausbeuten extrem niedrig und standen hinsichtlich des geplanten Einsatzes für immunologische Tests in keinem nutzbringenden Verhältnis zu den Mengen der eingesetzten Reagenzien.

IV. Diskussion

Stains-All-Färbung

Untersuchungen an SDS-Polyacrylamidgelen mit Phosvitin und Chondroitinsulfat als Standards zeigten im Gegensatz zu vergleichbaren Mengen an shp3 und 3a nur eine schwache, wenig sensitive Blaufärbung. Relativ zu Chondroitinsulfat wies Phosvitin noch eine stärkere Färbung auf. Wie spektroskopische Messungen an Protein-Farbstoff-Komplexen des Phosvitins zeigten, steigt die Intensität der Färbung mit dem abnehmenden mittleren Abstand der im Protein vorhandenen negativen Ladungen, was mit der „batterieähnlichen“ Anhäufung von Phosphoestergruppen erklärt wird [102]. Die sensitive Stains-All-Färbung von shp3 und 3a sollte daher auf eine dem Phosvitin ähnliche, dichte räumliche Anordnung von Phosphoestergruppen auf den *O*-Glykanen zurückzuführen sein. Die Frage, in wieweit DMAE diese intensive Färbung beeinflusst, bleibt noch ungeklärt. Demgegenüber läßt sich die schwache Färbung des Sulfat- und Carboxylgruppen tragenden Chondroitinsulfats durch deren zum Teil breitere Verteilung entlang der Glykankette, und damit der größeren Distanz untereinander, erklären. Es kommt daher zu wenig Protein-Farbstoff-Komplexen.

Mit Hilfe von Stains-All konnten inzwischen mehrere phosphat-tragende Proteine in den Scheiden der verwandten, humanpathogenen Spezies *Brugia malayi* identifiziert, sowie das exkretorisch-sekretorische Protein juveniler Filarien von *L. sigmodontis* – Juv-p120 – als phosphat- und DMAE-haltig charakterisiert werden (pers. Mitteilung Dr. Hintz).

Generell lassen sich mit der Stains-All-Färbung unter geringem Verbrauch an Probenmaterial phosphorylierte Proteine von nicht phosphorylierten unterscheiden und ggf. auf DMAE untersuchen.

Biosynthese von DMAE

DMAE konnte als Fmoc-Derivat einwandfrei identifiziert und als ein bisher einzigartiger Substituent *O*-glykosidisch modifizierter Proteine beschrieben werden. Die Tatsache, daß in den Mikrofilarienscheiden von *L. sigmodontis* dieses biogene Amin neben Spuren von Cholin und MMAE zu finden ist, läßt auf eine gezielte Biosynthese schließen. Die Herkunft dieses Substituenten bleibt allerdings noch völlig ungeklärt. Bisher sind nur zwei Synthesewege dokumentiert. Zum einen wird DMAE als Bestandteil des isolierbaren Lipids Phosphatidyl-DMAE gebildet, welches im Säugerorganismus durch sukzessive Methylierung von Phospha-

tidyl-Ethanolamin mittels Methyltransferasen zum Endprodukt Phosphatidyl-Cholin (Lecithin) entsteht (Kennedy-Zyklus). Jedoch ist dieses Lipid lediglich ein Zwischenprodukt dieser Synthese und existiert dementsprechend nur in geringen Mengen.

Zum anderen sind Pflanzen in der Lage, Phosphatidyl-DMAE im Bedarfsfall direkt zu synthetisieren [123]. Allerdings gibt es bisher keine deutlichen Hinweise über das enzymatische Spektrum dieser Synthesen. Die biologische Bereitstellung von Phosphatidyl-DMAE läßt die Annahme zu, daß evtl. nukleotidaktiviertes DMAE direkt auf das Lipidgerüst transferiert wird. Hinweise dazu sind Ergebnisse in Bezug auf CDP-Cholin, welches als Donormolekül einer CDP-Cholin-Transferase fungiert [124-126]. Entsprechende Hinweise bzgl. der Anheftung von DMAE gibt es bislang nicht; auch ist noch kein analoges CDP-DMAE biochemisch isoliert worden.

Aminosäureanalytisch untersuchte Überstände, die aus PBS-Extrakten adulter und juveniler Filarien stammten, weisen schon in der Präpatenz deutlich nachweisbare Mengen freien DMAEs auf (pers. Mitteilung Dr. Hintz). Zudem liefert die Analyse des exkretorisch-sekretorischen Proteins Juv-p120 eine enorm hohe DMAE-Modifikation [127]. Dieses schon in der Präpatenz adulter Filarien nachweisbare Protein beweist die intrauterine, selektive DMAE-Modifizierung sowohl sezernierter Proteine als auch von Strukturproteinen der Mikrofilarienscheide. Diese Befunde unterstützen die Annahme, daß DMAE schon in einer vollständig synthetisierten Form vorliegen muß, um anschließend als Donormolekül einer Transferase eingesetzt zu werden. Im Rahmen des Projekts wäre eine Untersuchung des DMAE-Syntheseweges und der dafür nötigen Transferasen von größtem Interesse, da Filarizide entwickelt werden könnten.

Die Untersuchung der Extraktionsüberstände bei *B. malayi* und *Setaria*-Arten hatten ebenfalls beträchtliche Mengen an DMAE ergeben. Andere verwandte, humanpathogene Arten wie *B. pahangi* und *W. bancrofti* waren, wenn überhaupt, in zu geringen Mengen verfügbar, um analog untersucht zu werden. Aus allen bisherigen Ergebnissen zeichnet sich jedoch ab, daß DMAE offenbar eine charakteristische Modifikation der lymphatischen Filarien ist, deren Mikrofilarien bescheidet sind. Alle anderen verfügbaren, nicht lymphatischen und nicht bescheidete Mikrofilarien produzierenden Filarienarten (*Ascaris* sp., *Acanthocheilonema* sp.) sind eindeutig DMAE-negativ (pers. Mitteilung Dr. Hintz). Hiermit könnte sich eine regelrecht neue Nematodenfamilie mit DMAE als strukturellem Marker herauskristallisieren.

Kohlenhydrate

Methodische Aspekte

Die Interpretation der Methylierungsanalysen der *O*-Glykane aus *L. sigmodontis* war trotz der GC/MS-Daten nur durch die MALDI-TOF-Massenspektrometrie möglich gewesen; zum einen durch die Spektren ihrer PMP-markierten Derivate, zum anderen durch die der methylierten und reduktiv beta-eliminierten Glykane. Wie aus beiden Derivatisierungsmethoden hervorging, wurden drei Glykanstrukturen, GalNAc, Gal-GalNAc und mit Phospho-DMAE substituiertes Gal-Gal-GalNAc identifiziert. Bei letzterer Verbindung konnte nur durch vergleichende Massenspektrometrie des HF-behandelten und nicht behandelten Glykans auf das Vorhandensein von sieben Phospho-DMAE geschlossen werden. Die massenspektrometrisch in Form ihrer PMP-Derivate identifizierten Strukturen GalNAc und Gal-GalNAc ließen sich in den Methylierungsanalysen als terminales GalNAc bzw. als terminale Galaktose und 3-verknüpftes GalNAc bestätigen. Für eine individuelle chromatographische Auftrennung der Glykane mit nachfolgender Analyse war das Material trotz großen Mengeneinsatzes nicht ausreichend.

Im Falle des Modells eines siebenfach mit Phospho-DMAE substituierten Trisaccharids deuteten die Daten der Methylierungsanalyse **nach** HF-Behandlung auf terminale Galaktose, 3-verknüpfte Galaktose sowie 3-verknüpftes GalNAc, welche das Modell eines aus MALDI-TOF-Spektren abgeleiteten Trisaccharids unterstützten. Methylierungsanalyse **vor** HF-Behandlung lieferte dagegen Hinweise auf eine vierfach mit Phospho-DMAE substituierten Gal-Rest. Durch HF-Behandlung **vor** Methylierung bzw. Acetylierung wurde weiterhin eine an Position C3 acetylierte Galaktose detektiert. Erfolgte HF-Behandlung **nach** der Methylierung, wurde eine an Position C2 und C3 acetylierte Galaktose bestimmt. Der Vergleich beider Analysenansätze – Methylierung **vor** bzw. **nach** HF-Behandlung – ließ bzgl. der internen Galaktose des postulierten Trisaccharids nur eine Verknüpfung über Position C3 und eine Substitution an Position C2 zu. Somit mußten sich die verbleibenden zwei Phospho-DMAE-Substituenten auf dem GalNAc befinden. Hier ergab die Analyse **nach** vorheriger HF-Behandlung eine 3-Verknüpfung des GalNAc; und die Methylierung **vor** HF-Behandlung nur terminales, also unsubstituiertes GalNAc, welches als Monomer anzusehen war. Nach dem postulierten Modell hätte ein dreifach substituiertes GalNAc detektiert werden müssen. Es konnten jedoch weder Signale einer dreifach substituierten Galaktose noch für ein zwei-

zweifach oder evtl. dreifach substituiertes GalNAc gefunden werden, um ein siebenfach mit Phospho-DMAE modifiziertes Trisaccharid zu konstruieren. Andererseits beweisen die MALDI-TOF-Analysen eindeutig ein solches Trisaccharid. Zudem wurde dieses Ergebnis zweimal reproduziert. Eine Erklärung für die fehlenden Signale bei der GC/MS-Analyse könnten Verluste während der Aufreinigung der Glykane oder ein zu geringer Response-Faktor im Massenspektrometer gewesen sein. Weiterhin gestaltete das Fehlen geeigneter Standardverbindungen die Interpretation der Signale partiell methylierter Alditolacetate schwierig.

Bei der MALDI-TOF-Analyse des methylierten, substituierten Trisaccharids ist das Na-Addukt des Molekül-Ions ungewöhnlich homogen, da keinerlei Signale geringerer oder höherer Substitution zu beobachten sind (Abb.22A). Aus biologischer Sicht ist es bemerkenswert, daß selektiv sieben Phospho-DMAE-Reste einheitlich übertragen werden, obwohl insgesamt neun OH-Gruppen zur Verfügung stünden. Postuliert man jedoch eine β -anomere Verknüpfung der Kohlenhydrate untereinander, so ergäbe sich eine rigide, geradlinige Struktur, in der tatsächlich nur noch sieben OH-Gruppen einer Transferase zugänglich wären; die Positionen C4 der internen Galaktose und des GalNAc wären in dieser Anordnung eventuell sterisch verdeckt.

Das Ergebnis der Kohlenhydratanalysen ist in einiger Hinsicht bemerkenswert. Neben den ausschließlich *O*-glykosidisch gebundenen Monosaccharid-Bausteinen *N*-Acetylgalaktosamin und Galaktose wurden keine *N*-Glykane gefunden. Auch das von Bardehle [61] bestimmte, äquimolare Verhältnis von *N*-Acetylgalaktosamin zu Uronsäure konnte nicht bestätigt werden; vielmehr kommen Uronsäuren nur in Spuren vor. Vermutlich ist das damalige Ergebnis darauf zurückzuführen, daß auf Grund der hohen Substitution der Kohlenhydrate durch Phospho-DMAE der analytisch zugängliche Anteil des *N*-Acetylgalaktosamins in mit Uronsäuren vergleichbaren Mengen vorlag. Das postulierte Strukturmodell eines polymeren Glykosaminoglykans ist also eindeutig widerlegt.

Immunologische Aspekte

Analog zu Beobachtungen bei verwandten Nematoden-Spezies weist auch *L. sigmodontis* keine sialylierten Glykane auf. Untersuchungen an exkretorisch-sekretorischen Produkten von *Toxocara canis* zeigten lediglich durch Fucose terminierte *O*-Glykane [45]. Ebenso weisen andere Glykokonjugate wie Glykolipide in *Caenorhabditis elegans* und *Ascaris suum* keine Sialylierung auf. Die in *L. sigmodontis* nachgewiesenen Kohlenhydratstrukturen besitzen keine der biologisch häufig beobachteten Terminationen wie Sialylierung, Sulfatierung und Fucosylierung.

Obwohl bislang keine Untersuchung der anomeren Verknüpfung erfolgt ist, läßt sich zumindest eine große Ähnlichkeit des *N*-Acetylgalaktosamins mit dem sog. Tn-Antigen (normales Thomsen-Antigen) und des Gal-GalNAc mit dem T-Antigen feststellen (Thomsen-Friedenreich-Antigen). Immunologisch ist dieser Befund von einigem Interesse, da solche „ungeschützten“ Strukturen ggf. eine Aktivierung des Immunsystems (Makrophagen) hervorrufen können. Das Tn- und das T-Antigen werden als „nackte *O*-Glykane“ bevorzugt und in hohem Maße auf Zelloberflächen bestimmter Tumorgewebe gefunden [128]. Zudem ist bekannt, daß Sialinsäuren auf Zelloberflächen einen Angriff durch das Complementsystem verhindern.

Allgemein wird die Exposition solcher nicht vollständig prozessierten Glykane auf die beschleunigte Expression der Zelloberflächenproteine zurückgeführt, so daß während des Durchschleusens der zu glykosylierenden Proteine durch die Golgi-Kompartimente keine Anheftung terminierender Substituenten erfolgt. Ein beim Parasiten ähnlich gelagerter Mechanismus scheint wenig wahrscheinlich. Vielmehr liegt generell keine aktive Sialyltransferase vor. Die Synthese dieser dem Immunsystem fremden Glykanstrukturen seitens des Parasiten würden sein Überleben im Wirt jedoch gefährden. Daher müssen andere Schutzmechanismen vorherrschen. *N*-Acetylgalaktosamin und Gal-GalNAc wurden vornehmlich den im tieferen Bereich der Mikrofilarienscheide befindlichen Polypeptide shp1 und shp1a zugeordnet, da sie nichtphosphorylierte und nicht DMAE tragende Proteine sind. Daher sind sie nicht auf der Scheidenoberfläche exponiert und für das Immunsystem des Wirts unzugänglich. Im Vergleich dazu scheint die Maskierung des Trisaccharids Gal-Gal-GalNAc durch über Phosphodiestergruppen verknüpftes DMAE offensichtlich. Dieses Glykan ist Hauptbestandteil der Modifikationen in den beiden Oberflächenproteinen shp3 und shp3a und durch den hohen Grad seiner Substitution als solches vom Immunsystem in bislang ungeklär-

ungeklärter Weise nicht identifizierbar. Zudem weist der Substituent DMAE physiologisch bedeutsame Eigenschaften auf, denn DMAE bzw. Phospho-DMAE besitzen *per se* antidepressive bzw. psychotonische Eigenschaften. Seit geraumer Zeit wird dies auch für kommerziell erhältliche Präparate genutzt.

PMP- und Anthranilsäure-Derivatisierung

Welche der beiden Derivatisierungsmethoden zu wählen ist, richtet sich nach der individuellen Fragestellung. Die Anthranilsäuremethode hat den großen Vorteil, mit sehr geringen Materialmengen auszukommen (unterer Picomol-Bereich pro Monosaccharid), und ist auf Grund der fluorimetischen Detektion sehr sensitiv, welche nur wenig durch Verunreinigungen gestört wird. Mittlerweile konnte die analytische Voruntersuchung von Probenmaterial auf Kohlenhydrate mittels dieser Methode erfolgreich etabliert und standardisiert werden. Über Nacht lassen sich somit im Auto-Sampler-System Proben quantitativ und qualitativ untersuchen. Erstmals ist es auch gelungen, die mit anderen Reagentien nur schwer derivatisierbaren Uronsäuren zu detektieren.

Demgegenüber ist die chromatographische Auftrennung PMP-markierter Glykane auf Grund ihrer Detektion im UV zuweilen durch stark absorbierende Verunreinigungen gestört. Auch ist eine etwas höhere Ausgangsmenge von mindestens 30pmol pro Monosaccharid zur Derivatisierung nötig, was unter anderem eine Untersuchung der in Spuren vorkommenden Uronsäuren von *L. sigmodontis* nicht möglich machte. Jedoch liegen die Vorteile der PMP-Markierung in der Derivatisierung größerer Glykane, z. B. Dextran, und deren mühelosen chromatographischen Auftrennung mit reverse-phase Chromatographie, vor allem aber in der massenspektrometrischen Detektion, da sich das Pyrazolon-Molekül im PMP leicht protonieren läßt. Monosaccharide können durch den Einbau zweier PMP-Moleküle in den von Matrix-Signalen ungestörten Meßbereich verschoben werden.

shp3a

Wie in Tab.5 aufgeführt, beläuft sich die Gesamtmasse aller Phospho-DMAE-Reste von shp3a auf ca. 18kDa, was einem relativen Anteil von ca. 40% entspricht. Ca. 26% der Molekülmasse bestehen aus O-Glykanen, sowie 25% aus Polypeptid. Durch die HF-Behandlung von shp3a konnte eine deutliche Zunahme des GalNAc-Anteils beobachtet werden. Des weiteren wurde Galaktose als Bestandteil der Modifikation entdeckt. Dieser Be-

fund ist auf die im Labor gängige Freisetzungsmethode von Kohlenhydraten zurückzuführen. Sie geht von einer schonenden Hydrolyse der glykosidischen Bindungen aus, kann aber Phosphoester- und -diesterbindungen, wie sie in diesem Fall vorlagen, nicht spalten. Dementsprechend konnten bislang nur die unsubstituierten, „flüchtigen“ Monosaccharide gaschromatographisch detektiert werden.

Nach Entfernung der Phosphoestergruppen mit HF sind nunmehr alle Glykane zugänglich. Das gaschromatographisch ermittelte, ungewöhnlich hohe Verhältnis von 5:1 bzgl. Gal:GalNAc wurde angesichts der Identifizierung des substituierten Trisaccharids Gal-Gal-GalNAc für die Berechnung der Gesamtmasse der Kohlenhydrate auf ca. 2:1 geschätzt.

Zieht man die Meßfehler bei der Bestimmung der Kohlenhydrate und des DMAE von ca. 10-20% in Betracht, so lassen sich bei der Gesamtmassenbestimmung von shp3a mindestens 90% belegen (41.5kDa). Somit kann die Existenz weiterer unbekannter Modifikationen ausgeschlossen werden.

Versuche, einen näheren Einblick in die Struktur der Modifikationen von shp3a und shp3 mittels Isolierung individueller proteolytischer Fragmente zu bekommen, waren auf Grund der außerordentlichen Resistenz der modifizierten Proteinregion gegenüber unspezifischen Enzymen nicht möglich gewesen. Andererseits erfüllen damit diese Oberflächenproteine ihre biologische Schutzfunktion vor Angriffen des Immunsystems.

Synthesen/Immunseren

Im Rahmen der immunologischen Charakterisierung der Oberflächenmodifikationen in den Scheiden von *L. sigmodontis* wurden zur Gewinnung von Antiseren sowohl synthetisch gewonnene als auch „native“ Antigene herangezogen. Bzgl. der synthetischen Antigene ist es gelungen, DMAE über Phosphodiesterbindungen an freie OH-Gruppen von Rinderinsulin, serumalbumin und Ovalbumin zu koppeln. Die Kopplungssynthesen mit Polypeptiden wurden ausschließlich auf die direkte Kopplung von Phospho-DMAE und die Isothiocyanat-Methode beschränkt, da sich die exakte Nachbildung des aus den Scheiden isolierten, substituierten Trisaccharids als außerordentlich schwierig und zeitaufwendig darstellte.

Die Ausbeuten an modifiziertem Rinderinsulin mit der direkten Kopplungsmethode waren gegenüber denen bei BSA sehr niedrig gewesen, was z. T. auf Verluste während der relativ sauren Reaktionsbedingungen, und damit auf einen hydrolytischen Abbau, zurückzuführen war. Des weiteren könnte Material während der chromatographischen Aufreinigung verloren

gegangen sein. Demgegenüber schienen die Verluste bei BSA unter denselben Bedingungen angesichts der hohen eingesetzten Mengen kompensiert worden zu sein. Ein weiterer Grund waren vermutlich die nicht-wäßrigen Reaktionsmedien, welche die Löslichkeit der Polypeptide herabsetzten. Generell war die relative Kopplungsausbeute gegenüber der Isothiocyanat-Methode, bei der gepufferte, wäßrige Medien verwendet wurden, jedoch erhöht. Im Vergleich mit dem sterisch anspruchsvollen p-Aminophenol-Molekül ist der Zugang des kleinen Phospho-DMAE-Moleküls zu den OH-Seitengruppen vermutlich erleichtert.

Auf Grund seiner geringen Masse ließ sich Insulin als einziges Polypeptid nach der Kopplung massenspektrometrisch genau charakterisieren, so daß eine exakte Anzahl veresterter OH-Seitengruppen bestimmt werden konnte.

Um zunächst ein möglichst strukturnahes Antigen zur Immunisierung einzusetzen, wurde auf Grund der geringen Mengen von shp3 und shp3a auf das exkretorisch-sekretorische Produkt Juv-p120 zurückgegriffen, welches ebenfalls an *O*-Glykane gebundenes Phospho-DMAE trägt, deren Strukturen aber noch nicht bestimmt wurden.

Mittlerweile konnten die gewonnenen Antiseren charakterisiert werden. Wie die ersten Ergebnisse zeigten, gab es positive Reaktionen gegen Juv-p120 sowie gegen Phosphatidyl-DMAE und -MMAE, welches auf PVDF-Folien präsentiert wurde (pers. Mitt. Dr. Hintz). Der Vergleich der Ergebnisse bzgl. dieser beiden DMAE tragenden Strukturen legt den Schluß nahe, daß das Serum sowohl DMAE selbst als auch teilweise seine „strukturelle Umgebung“ zu erkennen scheint. Zusammen mit den nunmehr in größeren Mengen verfügbaren synthetischen DMAE-Kopplungsprodukten ist der Weg zur Gewinnung DMAE-spezifischer Antikörper geebnet. Somit besteht auch die Möglichkeit, diese für Inhibierungs- oder auch Agglutinationsexperimente von Mikrofilarien einzusetzen.

V. Zusammenfassung und Ausblick

Mit Hilfe der Stains-All-Färbetechnik ist es möglich, die beiden Oberflächenproteine der Scheiden von *Litomosoides sigmodontis*, shp3 und shp3a, sensitiv und selektiv als phosphorylierte Proteine nachzuweisen. Auf diese Weise lassen sich auch andere, verwandte Nematodenspezies bzgl. phosphat-tragender Proteine im Gel voruntersuchen, die ggf. auch biogene Amine tragen.

Die Flüssigphasenhydrolyse von Scheidenmaterial sowie isolierter Glykoproteine mit 6M HCl und anschließender Fmoc-Analyse hat sich gegenüber der Gasphasenhydrolyse als geeignetere Methode erwiesen, um neben der Charakterisierung und quantitativen Freisetzung von Aminosäuren auch Aminozucker detektierbar zu machen.

Zur präparativen Isolierung größerer Mengen des Bausteins DMAE hat sich ein umgekehrtes Derivatisierungsverhältnis des Fmoc-Reagenzes gegenüber Aminosäuren bewährt. Zudem läßt sich DMAE selektiv aus Scheiden und Scheidenpolypeptiden wie shp3a durch schonende Behandlung mit Flußsäure herauslösen und als Fmoc-Derivat mit Hilfe der NMR-Spektroskopie strukturell belegen.

Da weder Glycerol noch signifikante Mengen des DMAE-Homologen Cholin in den Scheiden detektiert wurden, kann die Vermutung hinsichtlich vorhandener Teichonsäure nicht bestätigt werden. Des weiteren konnte das von Bardehle [129] postulierte Vorhandensein polymerer Glykosaminoglykane auf Grund des Spurenanteils von Uronsäuren widerlegt werden.

Die Untersuchungen am Scheidenpolypeptid shp3a haben ergeben, daß das hohe Ausmaß seiner Modifikationen fast ausschließlich auf die Anwesenheit der Kohlenhydrat-Bausteine *N*-Acetylgalaktosamin und Galaktose sowie auf DMAE-Reste zurückzuführen ist, die über Phosphodiesterbrücken mit dem Kohlenhydratanteil des Proteins verknüpft sind. Neben monomerem *N*-Acetylgalaktosamin und dem Disaccharid Galaktose-*N*-Acetylgalaktosamin konnte aus den Scheiden ein bisher unbekanntes Trisaccharid isoliert werden. Durch Methylierungsanalyse und MALDI-TOF-Massenspektrometrie ließ sich zeigen, daß das Trisaccharid aus den C3-verknüpften Monosacchariden Gal-Gal-GalNAc besteht und sieben Phospho-DMAE-Reste trägt, deren Positionen zum Teil im Molekül lokalisiert werden konnten.

Die Markierung kleinerer, reduzierender und neutraler Glykane mit dem Reagenz PMP, die Isolierung ihrer Derivate mittels HPLC und ihre Charakterisierung mit der MALDI-TOF-

Massenspektrometrie haben sich als leicht handhabbar, sensitiv, wenig aufwendig und schnell durchführbar herausgestellt. Der entscheidende Vorteil liegt in der Erhöhung der Molekülmasse um die des Reagenzes, was die Detektion im unteren Massenbereich erleichtert.

Die Verwendung von Anthranilsäure zur Derivatisierung ist durch die effektive HPLC-Automatisierung im Hause zu einer bequemen Methode quantitativer Bestimmung von Monosacchariden geworden, die eine für die gaschromatographische Analyse zeitaufwendige Aufarbeitung erspart.

Anhand von Rinderinsulin und -serumalbumin konnten die direkte Kopplung von Phospho-DMAE und die Kopplung mittels der Isothiocyanat-Methode erfolgreich etabliert und durchgeführt werden. Mit Hilfe der so gewonnenen Neokonjugate ist es möglich geworden, Antisera gegen den Baustein DMAE zu gewinnen und somit die Grundlage u.a. in Richtung Immunodiagnostik und Immunisierung gegen lymphatische Mikrofilarien gegeben.

VI. Literaturverzeichnis

- [1] WHO. Lymphatic Filariasis: The Disease and its Control. WHO Technical Report Series 821, 1-71 (1992)
- [2] J. Dönges
Parasitologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag (1988)
- [3] P. Wenk
Der Invasionsweg der metazyklischen Larven von *Litomosoides carinii* Chandler 1931 (Filariidae). Z. Parasitenkd. 28, 240-263 (1967)
- [4] D.S. Bertram
Dynamics of parasitic equilibrium in cotton rat filariasis. Adv. Parasitol. 4, 255-319 (1966)
- [5] D.W. Büttner und P. Rucz
Macro- and microfilariae in nodules from onchocerciasis patients in the Yemen Arab Republic. Tropenmed. Parasitol. 34, 113-121 (1991)
- [6] H. Schulz-Key
Ivermectin in the treatment of onchocerciasis. ISI Philadelphia, Atlas of Science, Pharmacology 1, 246-249 (1987)
- [7] R.M. Maizels und R.A. Lawrence
Immunological tolerance: The key feature in human filariasis? Parasitol. Today 7, 271-276 (1991)
- [8] D.I. Pritchard, C. Hewitt und R. Moqbel
The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helper 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths. Parasitol. Today 115, 533-544 (1997)
- [9] M. Karam und N. Weiss
Seroepidemiological investigations of onchocerciasis in a hyperendemic area of West Africa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34, 907-917 (1985)
- [10] E.A. Ottesen
Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis in man. Trans. Roy. Soc. Med. Hyg. 78 (Suppl.), 9-18 (1984)

- [11] N.W. Brattig, F.W. Tischendorf, G. Strate und C.E. Medina-de la Garza
Eosinophil-larval-interaction in onchocerciasis: Heterogeneity of *in vitro* adherence of eosinophils to infective third and fourth stage larvae and microfilariae of *Onchocerca volvulus*.
Parasite Immunol. 13, 13-22 (1991)
- [12] G. Strote, N.W. Brattig und F.W. Tischendorf
Ultrastructural study of the interaction between eosinophilic granulocytes and third and fourth stage larvae of *Onchocerca volvulus*.
Acta Tropica 48, 1-8 (1991)
- [13] M. Röllinghoff und M. Rommel
Immunologische und molekulare Parasitologie
Gustav Fischer Verlag, Jena, 1994
- [14] A. Haque und A. Capron
Filariasis: antigens and host-parasite interactions. In: T.T. Peapon (ed.) Towards new strategies for vaccines. Parasite Antigens 7, NY, 317-402 (1984)
- [15] B.T. Grenfell, E. Michael und D.A. Denham
A model for the dynamics of human lymphatic filariasis.
Parasitol. Today 7, 318-323 (1991)
- [16] J.A. Scott, E.M. MacDonald und B. Terman
A description of the stages in the life cycle of the Filarial worm *Litomosoides carinii*.
J. Parasitol. 37, 425-432 (1951)
- [17] H. Zahner, E.J.L. Soulsby, E. Weidner und G. Lämmler
Effect of diethyl carbamazine on the microfilariae of *Litomosoides carinii* in *Mastomys natalensis*: dynamics of cell adhesion, immobilization and elimination of microfilariae.
Tropenmed. Parasit. 29, 15-26 (1978)
- [18] H. Zahner und G. Schares
Experimental chemotherapy of filariasis: comparative evaluation of the efficacy of the filaricidal compounds in *Mastomys coucha* infected with *Litomosoides carinii*, *Acanthocheilonema viteae*, *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*.
Acta Tropica 52, 221-226 (1993)
- [19] R.J. Flynn
Parasites of laboratory animals.
Iowa state university press, Ames, Iowa, 425-427 (1973)

- [20] F. Hawking
The reproductive system of
Litomosoides carinii, a filar-
ial parasite of the cotton rat.
Ann. Trop. Med. Parasit. 48,
382-385 (1954)
- [21] P. Wenk, B. Illgen und
H.M. Seitz
In-vitro-Versuche mit
Litomosoides carinii
(Nematoda: Filarioidea).
Z. Parasitenkd. 55, 63-72
(1978)
- [22] J. Mössinger und P. Wenk
Fecundity of *Litomosoides*
carinii (Nematoda, Filar-
ioidea) *in vivo* and *in vitro*.
Z. Parasitenkd. 72, 121-131
(1986)
- [23] J. Mössinger
In vitro cultivation of adult
Litomosoides carinii: evalu-
ation of basic culture media,
gas phases and supplements.
Parasitology 103, 85-95
(1991)
- [24] A.E.R. Taylor
Maintenance of filarial
worms *in vitro*.
Experiment. Parasitol. 9,
113-120 (1960)
- [25] I. Kharat, U. Satyanarayana,
S.N. Ghirnikar und B.C.
Harinath
In vitro cultivation of *Wuchereria*
bancrofti microfilariae.
Indian J. Experiment. Biol.
18, 1245-1247 (1980)
- [26] E.D. Franke und P.P. Wein-
stein
Dipetalonema viteae
(Nematoda, Filarioidea):
culture of third stage larvae
to young adults *in vitro*.
Science 221, 161-162
(1983)
- [27] F. Engelbrecht und H.
Schulz-Key
Observations on adult
Onchocerca volvulus main-
tained *in vitro*.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med.
Hyg. 78, 212-215 (1984)
- [28] I. Kharat und B.C. Harinath
In vivo and *in vitro*
development of *Wuchereria*
bancrofti microfilariae.
Indian J. Med. Res. 82, 127-
132 (1985)
- [29] S. Townson, C. Connelly
und R. Muller
Optimizations of culture
conditions for the main-
tenance of *Onchocerca*
guttuosa adult worms *in*
vitro.
J. Helminth. 60, 323-330
(1986)

- [30] H.L. Callahan, J.M. Wakeman, R.K. Crouch und E.R. James
An *in vitro* radiolabel uptake viability assay for *Onchocerca* microfilariae.
J. Parasitol. 75, 142-144 (1989)
- [31] P.T. Soboslay, C.M. Dreweck, H.R. Taylor, B. Bratman, P. Wenk und B.M. Greene
Experimental onchocerciasis in chimpanzees: Cell-mediated immune response, and production and effect of IL-1 and IL-2 with *Onchocerca volvulus* infection.
J. Immunol. 147, 346-353 (1991)
- [32] P.T. Soboslay, C.M. Dreweck, H.R. Taylor, B. Bratman, H. Schulz-Key und B.M. Greene
Experimental onchocerciasis in chimpanzees: Antibody responses and antigen recognition after primary infection with *Onchocerca volvulus*.
Exp. Parasitol. 74, 367-380 (1992)
- [33] P.T. Soboslay, C.M. Dreweck, W.H. Hoffmann, C.G.K. Linder, C. Heuschkel, H. Görgen, M. Banla und H. Schulz-Key
Ivermectin-facilitated immunity in onchocerciasis. Reversal of lymphocytopenia cellular anergy and deficient cytokine production after single treatment.
Clin. Exp. Immunol. 89, 407-413 (1992)
- [34] W. Harnett und R.M.E. Parkhouse
The nature and function of nematode surface and excretory-secretory antigens.
In: Perspectives in nematode physiology and biochemistry, M.L. Sood (ed.), M/S Naredra Publication House, New Delhi (1993)
- [35] G.F. Mitchell und H.M. Levers
Studies on immune responses to parasite antigens in mice.
Int. Arch. Allergy appl. Immun. 52, 235-143 (1976)
- [36] E. Beckmann und D. Lewitt:
Phosphorylcholine on *Streptococcus pneumoniae* R 36a is responsible for *in vitro* polyclonal antibody secretion by human peripheral blood lymphocytes.
J. Immunol. 132, 2174-2176 (1984)
- [37] R.B. Lal, V. Kumaraswami, C. Steel und T.B. Nutman
Phosphocholine-containing antigens of *Brugia malayi* nonspecifically suppress lymphocyte function.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 42, 56-64 (1990)

- [38] M. Hintz, M. Kasper, B. Stahl, R. Geyer, H.-O. Kalinowski, M. Karas, S. Kühnhardt, H.-H. Schott, F. Conraths, H. Zahner und S. Stirm
Dimethylaminoethanol is a major component in the *Litomosoides carinii* microfilarial sheath.
Mol. Biochem. Parasitol. 76, 325-328 (1996)
- [39] H. Apfel, W.F. Eisenbeiss und T.F. Meyer
Changes in the surface composition after transmission of *Acanthocheilonema viteae* third stage larvae into the jird.
Mol. Biochem. Parasitol. 48, 1-8 (1991)
- [40] J. Srivatsan, D.F. Smith und R.D. Cummings
The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing the Lewis^x antigen.
J. Biol. Chem. 267, 20196-20203 (1992)
- [41] J. Srivatsan, D.F. Smith und R.D. Cummings
Schistosoma mansoni synthesizes novel biantennary Asn-linked oligosaccharides containing terminal β -linked *N*-acetylgalactosamine.
Glycobiology 2, 445-452 (1992)
- [42] G.J.v.Dam, A.A. Bergwerff, J.E. Thomas-Oates, J.P. Rotmans, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegthart und A.M. Deelder
The immunologically reactive *O*-linked polysaccharide chains derived from cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis^x as repeating unit.
Eur. J. Biochem. 225, 467-482 (1994)
- [43] K. Nyame, J.B. Pilcher, V. Tsang und R.D. Cummings
Infection of monkeys and humans with the helminthic parasite *Schistosoma mansoni* induces autoimmunity to the Lewis^x antigen.
Glycoconjugate J. 12, 531 (1995)
- [44] A.K. Nyame, J.B. Pilcher, V.C.W. Tsang und R.D. Cummings
Schistosoma mansoni infection in humans and primates induces cytolytic antibodies to surface Le^x determinants on myeloid cells.
Exp. Parasitol. 82, 191-200 (1996)
- [45] K.H. Khoo, R.M. Maizels, A.P. Page, G.W. Taylor, N.B. Rendell und A. Dell
Characterization of glycoproteins: the major *O*-glycans of *Toxocara* excretory-secretory antigens are *O*-methylated trisaccharides.
Glycobiology 1, 163-171 (1991)

- [46] H.L. Callahan, R.K. Crouch und E.R. James
Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants.
Parasitol. Today 4, 218-225 (1988)
 - [47] D.V. Pastrana, N. Raghavan, P. Fitzgerald, S. Eisinger, C. Metz, R. Bucala, R.P. Schleimer, C. Bickel und A.L. Scott
Filarial Nematode Parasites Secrete a Homologue of the Human Cytokine Macrophage Migration Inhibition Factor.
Infection and Immunity 66, 5955-5963 (1998)
 - [48] M. Philipp, M.J. Worms, D.J. McLaren, B.M. Ogilvie, R.M. Parkhouse und P.M. Taylor
Surface proteins of a filarial nematode: a major soluble antigen and a host component on the cuticle of *Litomosoides carinii*.
Parasite Immunol. 6, 63-82 (1984)
 - [49] T.J. Klonisch
Isolierung und Analysen der Mikrofilarien-Scheiden von *Brugia malayi* und *Brugia pahangi*.
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
 - [50] U. Schraermeyer, W. Peters und H. Zahner
Formation by the uterus of a peripheral layer of the sheath in microfilariae of *Litomosoides carinii* and *Brugia malayi*.
Parasitol. Res. 73, 557-564 (1987)
 - [51] M.G. Simpson und B.R. Laurence
Histochemical studies on microfilariae.
Parasitology 64, 61-88 (1972)
 - [52] G. Sayers, C.D. Mackenzie und D.A. Denham
Biochemical surface components of *Brugia pahangi* microfilariae.
Parasitology 89, 425-434 (1984)
 - [53] B. Hammerberg, Y. Rikihisa und M.W. King
Immunoglobulin interactions with surfaces of sheathed and unsheathed microfilariae.
Parasite Immunol. 6, 421-434 (1984)
 - [54] W. de Souza, T. Souto-Padron, G. Dreyer und L.D. de Andrade
Fine structure and localization of anionic sites on the surface of microfilariae of *Wuchereria bancrofti*.
J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 21, 121-129 (1989)
-

- [55] E. Devaney
Lectin-binding characteristics of *Brugia pahangi* microfilariae.
Trop. Med. Parasitol. 36, 25-28 (1985)
- [56] U.R. Rao, R. Chandrashekar und D. Subrahmanyam
Litomosoides carinii: characterization of surface carbohydrates of microfilariae and infective larvae.
Trop. Med. Parasitol. 38, 15-18 (1987)
- [57] U.R. Rao, R. Chandrashekar, P.B. Parab, G.R. Rajasekariah und D. Subrahmanyam
Lectin-binding characteristics of *Wuchereria bancrofti* microfilariae.
Acta Tropica 44, 35-42 (1987)
- [58] N.A. Kaushal, A.J.G. Simpson, R. Hussain und E.A. Ottesen
Brugia malayi: stage-specific expression of carbohydrates containing *N*-acetyl-D-glucosamine on the sheathed surfaces of microfilariae.
Exp. Parasitol. 58, 182-187 (1984)
- [59] J.A. Fuhrman und W.F. Piessens
Chitin synthesis and sheath morphogenesis in *Brugia malayi* microfilariae.
Mol. Biochem. Parasitol. 17, 93-104 (1985)
- [60] G. Bardehle, T. Klonisch, H.-H. Schott, S. Stirm und H. Zahner
Isolation of pure sheaths of *Litomosoides carinii* microfilariae.
Parasitol. Res. 74, 188-190 (1987)
- [61] G. Bardehle, A. Jepp-Libutzki, D. Linder, K. Moehnle, H.-H. Schott, H. Zahner, U. Zähringer und S. Stirm
Chemical composition of *Litomosoides carinii* microfilarial sheaths.
Acta Tropica 50, 237-247 (1992)
- [62] G. Bardehle, F.J. Conraths, F. Fahrenholz, M. Hintz, D. Linder, G. Schares, H.-H. Schott, B. Schützle, S. Stirm, W. Stüber und H. Zahner
A major *Litomosoides carinii* microfilarial sheath glycoprotein (gp22): amino terminal sequence and immunological studies with corresponding synthetic peptides.
Parasitology 103, 387-394 (1991)
- [63] G. Bardehle, M. Hintz, D. Linder, G. Schares, H.-H. Schott, S. Stirm und H. Zahner
Litomosoides carinii: extraction of the microfilarial sheath components and antigenicity of the sheath fractions.
Parasitol. Res. 78, 501-508 (1992)

- [64] H. Christ, J. Hirzmann, F. Conraths, H. Zahner, S. Stirm und G. Hobom
Trans-splicing of an early embryo mRNA in *Litomosoides carinii*, coding for the major microfilarial sheath protein gp22.
Gene 121, 219-226 (1992)
- [65] M. Hintz
Die Proteine der Mikrofilarienscheide von *Litomosoides carinii*.
Inaugural-Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Justus-Liebig-Universität Gießen (1994)
- [66] H. Zahner, G. Hobom und S. Stirm
The Microfilarial Sheath and its Proteins.
Parasitol. Today 11(3), 116-120 (1995)
- [67] G. Schares, B. Schützle, H. Zahner und F.J. Conraths
Surface antigens of *Litomosoides carinii* microfilariae: agglutinating antibodies react with 40 and 120 kiloDalton molecular mass.
Parasitology 109, 73-82 (1994)
- [68] K. Mehta, U.R. Rao, A.C. Vickery und P.J. Birckbichler
Significance of transglutaminase-catalyzed reactions in growth and development of filarial parasite, *Brugia malayi*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 1051-1057 (1990)
- [69] K. Mehta, U.R. Rao, A.C. Vickery und L. Fesus
Identification of novel transglutaminase from the filarial parasite *Brugia malayi* and its role in growth and development.
Mol. Biochem. Parasitol. 53, 1-16 (1992)
- [70] S.C Hubbard und R.J. Ivatt
Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides.
Ann. Rev. Biochem. 50, 556-583 (1981)
- [71] R. Kornfeld und S. Kornfeld
Assembly of asparagine-linked oligosaccharides.
Ann. Rev. Biochem. 54, 631-664 (1985)
- [72] C.B. Hirschberg und M.D. Snider
Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and golgi apparatus.
Ann. Rev. Biochem. 56, 63-87 (1987)
- [73] J. Roth
Subcellular organisation of glycosylation in mammalian cells.
Biochem. Biophys. Acta 906, 405-436 (1987)

- | | |
|--|---|
| <p>[74] P.W. Robins
Genetic regulation of asparagine-linked oligosaccharide synthesis. <i>Biochem. Soc. Trans.</i> <u>19</u>, 642-645 (1991)</p> <p>[75] S. Ganan, J.J. Cazzulo und A.J. Parodi
A major proportion of <i>N</i>-glycoproteins are transiently glucosylated in the endoplasmic reticulum. <i>Biochem.</i> <u>30</u>, 3098-3104 (1991)</p> <p>[76] A.W. Brändli
Mammalian glycosylation mutants as tools for the analysis and reconstruction of protein transport. <i>Biochem. J.</i> <u>276</u>, 1-12 (1991)</p> <p>[77] M.D. Skudlarek, M.-C. Orgebin-Crist und D.R.P. Tulsiani
Asparagine-linked glycoprotein biosynthesis in rat epididymis. <i>Biochem. J.</i> <u>277</u>, 213-221 (1991)</p> <p>[78] A. El Battari, P. Forget, F. Fouchier und P. Pic
Effect of inhibiting <i>N</i>-glycosylation or oligosaccharide processing on vasoactive intestinal peptide receptor binding activity and structure. <i>Biochem. J.</i> <u>278</u>, 527-533 (1991)</p> | <p>[79] D.J. Sharkey und R. Kornfeld
Development regulation of asparagine-linked oligosaccharide synthesis in <i>Dictyostelium discoideum</i>. <i>J. Biol. Chem.</i> <u>266</u>, 18485-18497 (1991)</p> <p>[80] A.D. Elbein
Glycosidase inhibitors: inhibitors of <i>N</i>-linked oligosaccharide processing. <i>FASEB J.</i> <u>5</u>, 3055-3063 (1991)</p> <p>[81] M.A Lehrman
Biosynthesis of <i>N</i>-acetylglucosamine-P-P-dolichol, the committed step of asparagine-linked oligosaccharide assembly. <i>Glycobiology</i> <u>1</u>, 553-562 (1991)</p> <p>[82] M.J. Spiro und R.G. Spiro
Potential regulation of <i>N</i>-glycosylation precursor through oligosaccharide-lipid hydrolase action and glucosyltransferase-glucosidase shuttle. <i>J. Biol. Chem.</i> <u>266</u>, 5311-5317 (1991)</p> <p>[83] H.A. Kaplan, J.K. Welply und W.J. Lennartz
Oligosaccharyltransferase: the central enzyme in the pathway of glycoprotein assembly. <i>Biochem. Biophys. Acta</i> <u>906</u>, 161-173 (1987)</p> |
|--|---|

- [84] C. Abeijon und C.B. Hirschberg
Topography of initiation of *N*-glycosylation reactions.
J. Biol. Chem. 265, 14691-14895 (1990)
- [85] C. Abeijon und C.B. Hirschberg
Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum.
TIBS 17, 32-36 (1992)
- [86] E. Bause
Studies on the receptor specificity of asparagine-*N*-glycosyl-transferase from rat liver.
FEBS Lett. 103, 296-299 (1979)
- [87] S. Einarsson, B. Josefsson und S. Lagerkvist
Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography.
J. Chromatography 282, 609-618 (1983)
- [88] K.L. Carraway und S.R. Hull
Cell surface mucin-type glycoproteins and mucin-like domains.
Glycobiology 1, 131-138 (1991)
- [89] E. Bause und H. Hettkamp
Primary structural requirements for *N*-glycosylation of peptides in rat liver.
FEBS Lett. 108, 341-344 (1979)
- [90] H. Nishimura, S. Kawabata, W. Kiesel, S. Hase, T. Ikenaka, T. Takao, Y. Shimoniishi und S. Iwanaga
Identification of a disaccharide (Xyl-Glc) and a trisaccharide (Xyl₂-Glc) *O*-glycosidically linked to a serine residue in the first epidermal growth factor-like domain of human factors VII an IX and protein Z and bovine protein Z.
J. Biol. Chem. 264, 20320-20325 (1989)
- [91] G.W. Hart, R.S. Haltiwanger, G.H. Holt und W.G. Kelly
Glycosylation in the nucleus and cytoplasm.
Ann. Rev. Biochem. 58, 841-871 (1989)
- [92] S. Hase und T. Ikenaka
Estimation of elution times on reverse-phase high-performance liquid chromatography of pyridylamino derivatives of sugar chains from glycoproteins.
Biochem. 184, 135-138 (1990)
- [93] E.J. Kentzer, A. Buko, G. Menon und V.K. Sarin
Carbohydrate composition and presence of a fucose-protein linkage in recombinant human prourokinase.
BCBP R.C. 171, 401-406 (1990)

- [94] A.M. Buko, E.J. Kentzer, A. Petros, G. Menon, E.R.P. Zuiderweg und V.K. Sarin
Characterisation of a post-translational fucosylation in the growth factor domain of urinary plasminogen activator.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3992-3996 (1991)
- [95] R.J. Harris, C.K. Leonard, A.W. Guzzetta und M.W. Spellman
Tissue plasminogen activator has an *O*-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain.
Biochem. 30, 2311-2314 (1991)
- [96] E.A. Higgins, K.A. Siminovich, D. Zhuang, I. Brockhausen und J.W. Dennis
Aberrant *O*-linked oligosaccharide biosynthesis in lymphocytes and platelets with the Wiscott-Aldrich syndrome.
J. Biol. Chem. 266, 6280-6290 (1991)
- [97] K.L. Carraway und S.R. Hull
O-glycosylation pathway for mucin-type glycoproteins.
BioEssays 4, 117-121 (1989)
- [98] T.L. Sheehan, A.G. Mayer und C.T. Wehr
Automated amino acid analysis using precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate; analysis of complex samples.
7th int. Symposium on HPLC of proteins, peptides and polynucleotides.
Washington, D.C., USA (1987)
- [99] G. Ogden und P. Földi
Amino acid analysis: an overview of current methods.
LC GC 5, 28-40 (1987)
- [100] I. Betner und P. Földi
The FMOC-ADAM approach to amino acid analysis.
LC GC International 2, 44-53 (1988)
- [101] H. Blum, H. Beier und H.J. Gross.
Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels.
Electrophoresis 8, 93-99 (1987)
- [102] M.R. Green, J.V. Pastevka und A.C. Peacock
Differential Staining of Phosphoproteins on Polyacrylamide Gels with a Cationic Carbocyanine Dye.
Anal. Biochem. 56, 43-51 (1973)

- [103] F. Hillenkamp und M. Karas
Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization.
In: J.A. McCloskey (ed.):
Mass spectrometry.
Methods Enzymol. 193,
280-294 (1990)
- [104] G. Schmidt
Hydrolysis of phospho-
ethanolamine.
Methods Enzymol. III, 358
- [105] H. Stadler und T. Nesselhut
Simple and rapid measurement of acetylcholine and choline by HPLC and enzymatic-electrochemical detection.
Neurochem. Int. 2, 125-127
(1986)
- [106] M.J. Kessler, T. Mise, R.D. Ghai und O.P. Bahl
Structure and Location of the *O*-Glycosidic Carbohydrate Units of Human Chorionic Gonadotropin.
J. Biol. Chem. 254, 7909-7914 (1979)
- [107] N.K. Karlsson, H. Karlsson und G.C. Hansson
Strategy for the investigation of *O*-linked oligosaccharides for mucins based on the separation into neutral, sialic acid- and sulfate-containing species.
Glycoconjugate J. 12, 69-76
(1995)
- [108] N.K. Karlsson und G.C. Hansson
Analysis of Monosaccharide Composition of Mucin Oligosaccharide Alditols by High Performance Anion-Exchange Chromatography.
Anal. Biochem. 224, 538-541 (1986)
- [109] S. Takasaki, T. Mizuochi und A. Kobata
Hydrazinolysis of Asparagine-Linked Sugar Chains to Produce Free Oligosaccharides.
Methods Enzymol. 179,
163-268 (1989)
- [110] N. Kuraya und S. Hase
Release of *O*-linked Sugar Chains from Glycoproteins with Anhydrous Hydrazine and Pyridylation of the Sugar Chains with Improved Reaction Conditions.
J. Biochem. 112, 122-126
(1992)
- [111] T. Patel, J. Bruce, A. Merry, C. Brigg, M. Wormald, A. Jaques und R. Parekh
Use of Hydrazine To Release in Intact and Unreduced Form both *N*- and *O*-linked Oligosaccharides from Glycoproteins.
Biochemistry 32, 679-693
(1993)

- [112] C.A. Cooper, N.H. Packer und J.W. Redmond
The elimination of O-linked glycans from glycoproteins under non-reducing conditions.
Glycoconjugate J. 11, 163-167 (1994)
- [113] H. Rauvala, J. Finne, T. Krusius, J. Kärkkäinen und J. Järnefeldt
Methylation techniques in the structural analysis of glycoproteins and glycolipids.
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 38, 389-416 (1981)
- [114] S. Hakamori
A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethylsulfoxide.
J. Biochem. 55, 205-207 (1984)
- [115] S.B. Levery und S.I. Hakamori
Microscale methylation analysis of glycolipids using capillary gas chromatography-chemical ionization mass fragmentography with ion monitoring.
Methods Enzymol. 138, 13-25 (1987)
- [116] J. Paz Parente, P. Cardon, Y. Leroy, J. Montreuil und B. Fournet
A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion.
Carb. Res. 141, 41-47 (1985)
- [117] V.H. Björndahl, C.G. Hellerquist, B. Lindberg und S. Svensson
Gas-Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie bei der Methylierungsanalyse von Polysacchariden.
Angew. Chem. 82, 643-674 (1970)
- [118] R. Geyer, H. Geyer, S. Kühnhardt, W. Mink und S. Stirm
Capillary gas chromatography of methylhexitol acetates obtained upon methylation of *N*-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides.
Anal. Biochem. 121, 263-274 (1982)
- [119] R. Geyer, H. Geyer, S. Kühnhardt, W. Mink und S. Stirm
Methylation analysis of complex carbohydrates in small amounts: capillary gas chromatography-mass fragmentography of methylalditol acetates obtained from *N*-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides.
Anal. Biochem. 133, 197-207 (1983)

- [120] S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi und J. Nakamura
High-Performance Liquid Chromatography of reducing carbohydrates of strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives.
Anal. Biochem. 180, 351-357 (1989)
- [121] K.R. Anumula
Quantitative Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by High-Performance Liquid Chromatography with Highly Sensitive Fluorescence Detection.
Anal. Biochem. 220, 275 (1994)
- [122] A. Rifai und S.S. Wong
Preparation of phosphorylcholine-conjugated antigens.
J. Immunol. Meth. 94, 25-30 (1986)
- [123] M. Harwood und J.L. Harwood
Alternative pathways for phosphatidylcholine synthesis in olive (*Olea europaea* L.) callus cultures.
Biochem. J. 304, 463-468 (1994)
- [124] K.M. Houston und W. Harnett
Prevention of attachment of phosphorylcholine to a major excretory-secretory product of *Acanthocheilonema viteae* using Tunicamycin
J. Parasitology 82, 320-324 (1996)
- [125] K.M. Houston und W. Harnett
Mechanisms underlying the transfer of phosphorylcholine to filarial nematode kinase.
Parasitology 118, 311-318 (1999)
- [126] P. Lim, R. Cornell und D.E. Vance
The supply of both CDP-choline and diacylglycerol can regulate the rate of phosphatidylcholine synthesis in HeLa cells.
Biochem. Cell Biol. 64, 692-698 (1986)
- [127] M. Hintz, A. Taubert, R. Geyer, H. Zahner, S. Stirm und F. J. Conraths
Juvenile female *Litomosoides sigmodontis* produce an excretory/secretory antigen (Juv-p120) highly modified with dimethylaminoethanol.
Parasitology 3, 265-271 (1998)
- [128] I. Brockhausen, D. Toki, J. Brockhausen, S. Peters, T. Bielfeldt, A. Kleen, H. Paulsen, M. Meldal, F. Hagen und L.A. Tabak
Specificity of *O*-glycosylation by bovine colostrum UDP-GalNAc: polypeptide α -*N*-acetylgalactosaminyltransferase using synthetic glycopeptide substrates.
Glycoconjugate J. 13, 849-856 (1996)
-

- [130] G. Bardehle
Isolierung und biochemische Analysen der Mikrofilarienscheiden von *Litomosoides carinii* (Nematoda, Filarioidea).
Inaugural-Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Justus-Liebig-Universität Gießen (1990)

Danksagung

Meinem Doktorvater, Prof. Rudolf Geyer, möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit und die Gelegenheit zur Selbstentfaltung danken.

Herrn Prof. Stefan Stirm danke ich für die vielen inspirierenden Ideen und die ermöglichten Kontakte zu anderen Arbeitsgruppen.

Frau Christina „Tina“ Schmidt und Paul Weber sei mein großer Dank für die stets hervorragend ablaufende Scheidenisolation, die vielen Gele und herzlichen Gedankenaustausche.

Herrn Horst Thiele danke ich für die unschätzbare technische Unterstützung bei der HPLC und immer, wenn es in der Analytik „gebrannt“ hatte.

Den „Kellerkindern“ Werner Mink, Peter Käse und Siegfried Kühnhardt habe ich sowohl für die präzise und verlässlichen Analysen der Kohlenhydrate als auch für die persönlichen angenehmen Kontakte und Gedankenaustausche zu danken.

Den Doktores Dietmar und Monica Linder sei mein Dank für die technische und wissenschaftliche Unterstützung bei vielen Gelegenheiten, aber auch für die mir entgegengebrachte persönliche Sympathie.

Zu guter Letzt möchte ich meinem lieben Kollegen Dr. Martin Hintz für die Anregungen, die ich in vielen Diskussionen mit ihm erhielt, danken. Sie waren mir stets ein Ansporn zu Disziplin und wissenschaftlichem Denken.

Allen anderen Mitarbeitern und Gruppenleitern des Biochemischen Instituts danke ich herzlich für den freundschaftlichen Gedankenaustausch, der mir half, „über den Tellerrand“ hinaus zu blicken.